

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE MEDICINA**



**“PERFIL PROTÉOMICO EN SUERO MATERNO DE EMBARAZOS CON
SÍNDROME DE DOWN”**

**Por
DR. CARLOS HORACIO BURCIAGA FLORES**

**COMO REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE ESPECIALISTA EN
GENÉTICA MÉDICA
FEBRERO 2016**

**“PERFIL PROTÉOMICO EN SUERO MATERNO DE EMBARAZOS CON
SÍNDROME DE DOWN”**

Aprobación de tesis:

Dra. Graciela Arellí López Uriarte
Directora de tesis

DC. Víctor Manuel Torres de la Cruz
Co-Director de tesis

Dra. Med. Laura Elia Martínez de Villareal
Jefa del departamento de Genética

Dr. Med. Gerardo Enrique Muñoz Maldonado
Subdirector de Estudios de Posgrado

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar a mi familia en particular a mis padres por apoyarme y guiarme cuando conocía el fin pero no quería recorrer el camino, a mis hermanos ya que sin su apoyo no hubiera podido iniciar en el camino de la genética.

Al invaluable grupo R.A por estar a mi lado por casi 15 años valorando mutuamente nuestro crecimiento académico y personal.

A mis profesores: Dra. Med Laura Martínez de Villareal por darme la oportunidad y enseñarme no solo de medicina sino lecciones de vida, Dra. Beatriz de la Fuente por compartir su amplia experiencia en el área y ofrecer su amistad, Dra. Graciela Arellano López excelente tutora y maestra que en gran parte hizo este trabajo posible, Dra. Marisol Ibarra a quien podía acudir con cualquier duda tanto personal como académica, Dr. Luis Daniel Campos por impulsarme siempre a buscar más allá de lo establecido, Dra Dolores Hernández por enseñarme disciplina en el estudio, Dra. Roble Velazco y QCB Luz Rojas excelentes y comprensivas maestras presentes en los momentos más difíciles, Dr. Miguel Ángel Dector, Dra. Carmen Barbosa, Dr. Hugo Gallardo por aceptarme en mis inicios y enseñarme la parte más bonita de la genética, D.C. Victor Torres por mostrarme una visión diferente de la ciencia, QCB Liliana Romero por su enorme ayuda en la tesis, QCB Rosario Torres y QCB Erick García por compartirme su pasión por la bioquímica, QCB José Lugo quien estuvo siempre con la disposición de ayudarme, QCB Alejandra Aguirre por su paciencia y ayuda incondicional, M.C. Iram Rodríguez y M.C. Michelle Zamudio por brindarme su amistad, M.C. Viviana Gómez, QCB Gloria Gracia y QCB Carmen Quezada por mostrarme la citogenética; todos excelentes profesionistas y amables personas.

A todo el personal del departamento de genética tanto secretarias, técnicos, intendentes y administrativos por brindarme su amistad y comprensión.

A mis compañeras residentes por apoyarme e impulsarme a crecer.

A mis amigos médicos dispersos en varios estados que nos separamos para alcanzar nuestros sueños los cuales de vez en cuando se cruzaban.

Por ultimo a mis compañeros con los que he vivido 3 años con quienes comparto tantas experiencias día a día

TABLA DE CONTENIDO

Página

CAPITULO I

1. Resumen.....	1
------------------------	----------

CAPITULO II

2. INTRODUCCIÓN.....	3
2.1 Definición del problema.....	3
2.2 Antecedentes.....	3
2.3 Epidemiología.....	4
2.4 Etiopatología.....	5
2.5 Cuadro clínico y diagnóstico.....	7
2.6 Asesoría genética.....	9
2.7 Diagnóstico prenatal.....	10
2.7.1 Métodos no invasivos.....	11
2.7.1.1 Marcadores ecográficos.....	11
2.7.1.2 Marcadores bioquímicos.....	12
2.7.1.3 DNA libre fetal.....	15
2.7.1.4 Proteómica.....	16
2.7.2 Métodos invasivos.....	18
2.7.2.1 Biopsia de vellosidades coriales.....	18
2.7.2.2 Amniocentesis.....	19
2.7.2.3 Cordocentesis.....	19
2.8 Proteómica vs otros biomarcadores.....	21
2.9 Antecedentes en proteómica.....	22

2.10Justificación.....	23
CAPITULO III	
3. HIPÓTESIS.....	24
3.1 Hipótesis de investigación.....	24
3.2 Hipótesis nula.....	24
CAPITULO IV	
4. OBJETIVOS.....	25
4.1 Objetivo general.....	25
4.2 Objetivos específicos.....	25
CAPITULO V	
5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	26
5.1 Tipo de estudio.....	26
5.2 Grupos de estudio.....	26
5.3 Criterios de inclusión.....	26
5.3.1 Casos.....	26
5.3.2 Controles.....	26
5.4 Criterios de Exclusión.....	27
5.5 Criterios de Eliminación.....	27
5.6 Descripción del diseño	27
5.6.1 Recolección de la muestra.....	27
5.6.2 Almacenamiento de la muestra.....	28
5.6.3 Depleción de Albúmina/IgG	28
5.6.4 Diafiltración y concentración de proteínas	30
5.6.5 Digestión por Tripsina	31
5.6.6 Separación cromatográfica y detección.....	32
5.6.7 Procesamiento de datos.....	34
5.7 Esquema de la estrategia general	36
CAPITULO VI	
6. RESULTADOS.....	37
6.1. Datos demográficos.....	37

6.2. Resultados ultrasonográficos.....	38
6.3. Resultados citogenéticos.....	40
6.4. Resultados proteómicos.....	42
CAPITULO VII	
7. DISCUSIÓN.....	54
CAPITULO VIII	
8. CONCLUSIÓN.....	65
CAPITULO IX	
9. ANEXOS.....	67
9.1. Carta de consentimiento informado.....	67
9.2. Hoja de recolección de datos.....	76
CAPITULO X	
10. BIBLIOGRAFIA.....	79
CAPITULO XI	
11. AUTOBIOGRAFIA.....	82

INDICE DE TABLAS

1. Incidencia de Síndrome de Down según edad materna.....	5
2. Variantes citogenéticas de Síndrome de Down.....	5
3. Origen de la no disyunción en Síndrome de Down.....	5
4. Criterios de Hall.....	7
5. Riesgo de recurrencia en sucesivos embarazos según el cariotipo del paciente afectado con Síndrome de Down.....	10
6. Tabla comparativa de métodos no invasivos (Ecográficos y Bioquímicos).....	14
7. Tabla comparativa entre métodos no invasivos.....	21
8. Composición de las fracciones realizadas en cada muestra.....	33
9. Composición de la separación analítica.....	34
10. Datos demográficos.....	38
11. Concentración protéica y depleción de albúmina/IgG.....	43
12. Proteínas con el nivel de expresión más significativo.....	47
13. Proteínas sobreexpresadas en mujeres con embarazo con feto con SD..	48
14. Proteínas subexpresadas en mujeres con embarazo con feto con SD.....	49
15. Proteínas expresadas únicamente en mujeres con embarazo con feto con SD.....	50
16. Distribución de las proteínas encontradas exclusivamente en embarazos con feto con SD según su vía biológica.....	52
17. Comparación de proteínas encontradas en embarazos con feto con SD en diferentes estudios.....	57

18. Comparativa entre las rutas biológicas de las proteínas encontradas en función al grupo de embarazadas con feto con SD.....	58
---	----

INDICE DE FIGURAS

1. Características clínicas y complicaciones en Síndrome de Down.....	9
2. Diagrama de conexiones del sistema nano Acquity para las separaciones cromatográficas.....	33
3. Diagrama del sistema de espectrometría de masas Q-TOF premier XE.....	35
4. Esquema de la estrategia general.....	36
5. Datos ultrasonográficos de mujeres con embarazo con SD.....	39
6. Distribución por edades de casos positivos y sospechosos para SD.....	40
7. Cariotipo en líquido amniótico bandas GTG del caso 1 con trisomía 21...	41
8. Cariotipo en líquido amniótico bandas GTG del caso 1 con trisomía 21....	42
9. Comparación intragrupo de la fracción 2 de cromatogramas del grupo de mujeres embarazadas con fetos con SD.....	44
10. Comparación intragrupo de la fracción 3 de cromatogramas del grupo de mujeres embarazadas con feto sano por ultrasonido.....	45
11. Comparación intragrupo de la fracción 3 de cromatogramas del grupo de mujeres no embarazadas.....	47
12. Comparación intergrupos de la fracción 3 de los tres grupos estudiados.....	48
13. Perfil de expresión normalizado de 290 proteínas del grupo de mujeres con embarazos con feto sano por ultrasonido.....	46

14. Perfil de expresión comparativa entre los dos grupos de mujeres embarazadas.....	47
15. Interactoma de la plasminógeno en la vía de disolución de coágulos de fibrina.....	60
16. Interactoma del plasminógeno en la vía de formación placas de Beta amiloide y metabolismo de la proteína precursora de amiloide activo	61
17. Interactoma de ApoE en la vía de Alzheimer.....	63

CAPITULO I

1. RESUMEN

El diagnóstico prenatal ha tomado una gran importancia en las últimas décadas proponiendo mejoras en los métodos de detección volviéndose más eficientes, seguros y precoces. La necesidad creciente en este campo se debe principalmente a que en la sociedad urbana actual los embarazos ocurren a edades mayores aumentando el riesgo de cromosomopatías por lo que la detección precoz y adecuada puede ayudar a tomar alguna decisión acerca de la continuación de la gestación o preparación de la familia y del personal médico para una mejor atención del producto.

El síndrome de Down es la cromosomopatía autosómica más frecuente por lo que los esfuerzos realizados en el campo del diagnóstico prenatal son principalmente enfocados en la detección de fetos con esta afección la cual puede tener consecuencias en la salud del producto permitiendo ser detectadas y tratadas a tiempo como en caso de cardiopatías congénitas las cuales son prevalentes en este grupo de pacientes comparadas con la población en general.

Las pruebas diagnósticas en esta área hasta el momento son pruebas invasivas las cuales conllevan riesgo para la madre y el producto además deben ser realizadas por personal capacitado, por lo cual se implementaron pruebas más seguras llamadas métodos no invasivos los cuales, aunque no son diagnósticos sino de tamizaje, han mejorado el índice de detección desde el basado en la edad materna hasta técnicas más sofisticadas como el DNA libre fetal o técnicas proteómicas todo esto con la finalidad de lograr una mejor selección de las pacientes sometidas a pruebas invasivas evitando procedimientos que pongan en riesgo innecesario al binomio madre-feto.

La proteómica, siendo el más nuevo competidor en esta área, nos permite obtener un análisis detallado del perfil proteico de tejidos biológicos y fluidos en un momento y condición determinado y a partir de ello realizar una comparación entre condiciones fisiológicas normales y patológicas, por lo que en este estudio se pretende analizar tres grupos de mujeres con condiciones clave para determinar la utilidad de este método por medio de la identificación y cuantificación de proteínas para lograr demostrar una diferencia entre las condiciones protéicas durante el periodo de gestación en situación fisiológica o patológica de feto y usando de control interno mujeres no embarazadas.

CAPITULO II

2. INTRODUCCIÓN

2.1 Definición del problema

El síndrome de Down (SD) es la aneuploidía más frecuente en nacidos vivos y la causa genética más frecuente de discapacidad intelectual, así como de una serie de malformaciones que aumentan la morbi-mortalidad de estos pacientes. Por medio de este estudio se propone determinar el perfil proteómico en suero materno, identificando biomarcadores específicos cuantificables para SD para en un futuro estandarizar un nuevo método de tamizaje que ayude a la detección prentatal de este padecimiento.

2.2 Antecedentes

El Síndrome de Down (SD), también llamado trisomía 21, se describe por primera vez por los franceses Jean-Etienne-Dominique Esquirol en 1838 y Edouard Séguin en 1846. Esquirol, en su primer libro, dedicó una sección que denominó “Idiocy”, que ahora se refiere a discapacidad intelectual o retraso mental además describió el fenotipo característico de estos pacientes. Posteriormente, en 1856 y 1866 este mismo autor publicó que a pesar del “profound idiocy”, estos “buenos niños” podían presentar mejoría en su lenguaje y adquirir ciertos conocimientos básicos. Esquirol denominó a esta patología “cretinismo furfuráceo” por la apariencia que presentaban. (1). En 1866 John Langdon Down luego de graduarse en la Facultad de Medicina del Hospital de Londres, fue designado como médico superintendente en el asilo Real de Earlswood para pacientes con discapacidad intelectual donde los clasifica como “Mongolian idiocy” término derivado del grupo étnico mongol.(2). El término “Mongolian idiocy” se utilizó hasta 1961 cuando en la revista Lancet se le dan 4 denominaciones (Anomalía Langdon Down, síndrome de Down, trisomía 21 y acromicria congénita).(3). Posteriormente el término de SD fue confirmado por la OMS en 1965.(4). Ese mismo año

Diamandopoulos y col. reportan la existencia de una estatuilla neolítica en Grecia con características compatibles con SD, ésta tiene 7.000 años, lo que puede corresponder la representación más antigua de la entidad en el mundo occidental.(5). En 1956, Joe Hin Tjio y Albert Levan describieron que la especie humana presentaba 46 cromosomas, y no 48 como se suponía y en 1961 Jérôme Lejeune, Marthe Gautier y Raymond Turpin descubrieron que el SD respondía a una alteración genética, debido a un tercer cromosoma 21.(6). En el número del 18 de mayo de 2000 de la revista Nature apareció el producto final de la secuenciación del cromosoma 21 reportándose 225 genes (127 ya conocidos y 98 previsibles) y posteriormente definiendo la región crítica un área de aproximadamente 1.6 Mb en 21q22-q23 la cual al triplicarse es suficiente para causar el fenotipo clásico de SD.(7)

En el siglo XX el SD se había convertido en la forma más reconocible de la discapacidad intelectual, durante los primeros dos tercios de este siglo la mayoría de los pacientes con SD fueron hospitalizados en instituciones psiquiátricas donde no recibían atención médica adecuada para los problemas sistémicos asociados a SD por lo que la mayoría fallecían en la infancia o en la vida adulta temprana. Con el auge del movimiento de eugenesia, 33 de los (entonces) 48 estados de Estados Unidos de América y varios países de Europa iniciaron programas de esterilización forzada de las personas con SD y otras patologías con grados de discapacidad similares. Como en el Aktion T4 de la Alemania nazi.(8)

2.3 Epidemiología

Su incidencia es de 1:800 a 1000 RNV a nivel mundial y de 1:650 en México.(9). La incidencia es similar en las diversas etnias pero aumenta en función de la edad materna: 1:800 (30-34 años), 1:270 (35-39 años), 1: 100 (40-44 años), 1:50 (mayores de 45 años)(Tabla1). Sin embargo, la mayoría de los niños con SD nacen de madres menores de 30 años, por ser la edad en que suele haber más embarazos.(10).

Tabla 1 **INCIDENCIA DE SÍNDROME DE DOWN SEGÚN EDAD MATERNA**

Edad materna	Incidencia SD	Edad materna	Incidencia SD	Edad materna	Incidencia SD
20	1:2000	30	1:900	40	1:100
21	1:1700	31	1:800	41	1:80
22	1:1500	32	1:720	42	1:70
23	1:1400	33	1:600	43	1:50
24	1:1300	34	1:150	44	1:40
25	1:1200	35	1:350	45	1:30
26	1:1100	36	1:300	46	1:25
27	1:1050	37	1:250	47	1:20
28	1:1000	38	1:200	48	1:15
29	1:950	39	1:150	49	1:10

The National Down Syndrome Society 2012

2.4 Etiopatología

El SD es el resultado de una anomalía cromosómica numérica por la que los núcleos de las células del organismo humano poseen 47 cromosomas en lugar de 46, perteneciendo el cromosoma excedente o extra al par 21.(10). El SD presenta 5 variantes citogenéticas(como se muestra en Tabla 2).

Tabla2 **VARIANTES CITOGÉNÉTICAS DE SÍNDROME DE DOWN**

Variante	Trisomía regular	Translocaciones robertsonianas	Isocromosoma del brazo largo	Mosaicismo	Trisomía parcial de región crítica
Cariotipo	Cariotipo 47,XX,+21 ó 47,XY,+21	Cariotipo 46,XX o XY, rob(D o G;21)(q10;q10), +21*	Cariotipo 46,XX o XY,+21, i(21)(q10)	Cariotipo 47,XX o XY, +21/46,XX o XY	Cariotipo 46,XX o XY, dup(21)(q22.3)
Porcentaje	~95%	4%**		1-3%	<1%

*D o G representan los grupos de cromosomas con los que puede realizar la translocación

** Las translocaciones robertsonianas junto con el isocromosoma corresponden al 4%

La causa de esta anomalía es por una no disyunción la cual generalmente es de origen materno (Tabla 3).

Tabla 3 **ORIGEN DE LA NO DISYUNCIÓN EN SÍNDROME DE DOWN**

Meiosis materna I	Meiosis materna II	Meiosis paterna I	Meiosis paterna II	Mitosis
-------------------	--------------------	-------------------	--------------------	---------

~70%	20%	3%	5%	4%
------	-----	----	----	----

Es producida en el 95% de los casos por una trisomía 21 (3 copias completas del cromosoma 21) debido a una no disyunción meiótica (no separación) generalmente del óvulo en meiosis I o II, teniendo un riesgo de recurrencia de 0.5% en función de la edad.

El 4% de los casos es por una translocación robertsoniana (unión entre dos cromosomas acrocéntricos) siendo más comúnmente el 14 seguido por el 22, al tener un caso de este tipo es importante realizar un cariotipo a ambos padres para determinar el origen ya que el riesgo empírico de recurrencia es ~12 % si el portador de la translocación es la madre, y 1-2 % si es el padre.

El 1% de los casos es por mosaicismo, en el que un individuo presenta dos o más líneas celulares provenientes del mismo cigoto en su organismo, de las cuales al menos una debe presentar trisomía 21 . El mosaicismo se debe a una no disyunción durante las primeras divisiones celulares post-concepción, es decir, durante la mitosis. La proporción de la línea trisómica varía entre individuos (a mayor proporción de la línea trisómica mayor probabilidad de que el individuo presente el fenotipo clásico de SD y sus complicaciones), así como la representación de cada línea celular en los diferentes tejidos.

El resto de los casos, que constituye menos de 1%, pueden presentar rearrreglos cromosómicos no visibles por cariotipo los cuales abarcan la región crítica para SD en el cromosoma 21 (21q22.2 q22.3) la cual hasta el momento se ha identificado como causante del fenotipo característico en esta entidad.

Como consecuencia de esta alteración, existe un incremento en las copias de genes del cromosoma 21, lo que origina una grave perturbación en la expresión de muy diversos genes, no sólo en el cromosoma 21 sino de otros cromosomas. Este desequilibrio génico ocasiona modificaciones en el desarrollo y función de los órganos y sistemas, tanto en las etapas prenatales como postnatales (10), lo que

resulta en las características físicas visibles y diagnosticables; el sistema más comúnmente afectado es el sistema nervioso y dentro de él, el cerebro y cerebelo; por lo que todos los pacientes con SD presentarán algún grado de discapacidad intelectual. La expresión génica variará según el individuo por lo que vemos en estos pacientes un grado de afección distinto en los diferentes órganos y sistemas motivo por el cual cada caso debe valorarse de manera individual incluyendo la discapacidad intelectual.

2.5 Cuadro clínico y diagnóstico

Al nacimiento los pacientes presentan una serie de características físicas que se engloban en criterios para su diagnóstico clínico llamados Criterios de Hall.(11) (Tabla 4).

Tabla 4 **CRITERIOS DE HALL**

Característica	Porcentaje
Perfil plano del rostro	90%
Moro incompleto	85%
Hiperlaxitud articular	80%
Aperturas palpebrales desviadas hacia arriba	80%
Redundancia nuchal (exceso de piel)	80%
Hipotonía	80%
Displasia congénita de cadera	70%
Pabellones auriculares displásicos (pequeños y redondos)	60%
Clinodactilia del 5° dedo	60%
Pliegues aberrantes en manos	45%

Adaptada de Tolmie 1998

El diagnóstico de SD al nacimiento se hace de manera clínica y este se realiza al presentar al menos 4 de los 10 criterios clínicos de Hall y para confirmar el diagnóstico y conocer la etiología exacta se realiza un análisis de cariotipo de bandas GTG, por lo general de linfocitos. Cabe destacar que estos criterios clínicos se observan en el recién nacido ya que posteriormente pueden no estar

presentes aunque se logran hacer evidentes algunos otros datos clave o problemas médicos asociados a la patología de base a los que hay que poner especial atención ya que algunos de ellos pueden comprometer la esperanza de vida del paciente.

El cariotipo es una herramienta de citogenética que se utiliza para la detección de anomalías cromosómicas numéricas y estructurales de tamaño mayor a 5 kilobases, se basa la detección de los cromosomas metafásicos en cultivo celular por medio de tinción y observación en microscopia de luz, esta técnica permite confirmar el diagnóstico de SD en la mayoría de los casos además de orientarnos acerca del mecanismo (anteriormente mencionados) que produjo la patología y de esta forma ofrecer el asesoramiento genético a la familia del afectado con SD.

Hay una serie de características clínicas y complicaciones asociadas a SD que se presentarán a lo largo de la vida del paciente y su mención es de especial importancia ya que el conocimiento de las mismas nos llevará a anticiparlas y tratarlas en la medida que se requiera. A continuación se muestran las principales (Figura 1).

CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS Y COMPLICACIONES EN SÍNDROME DE DOWN

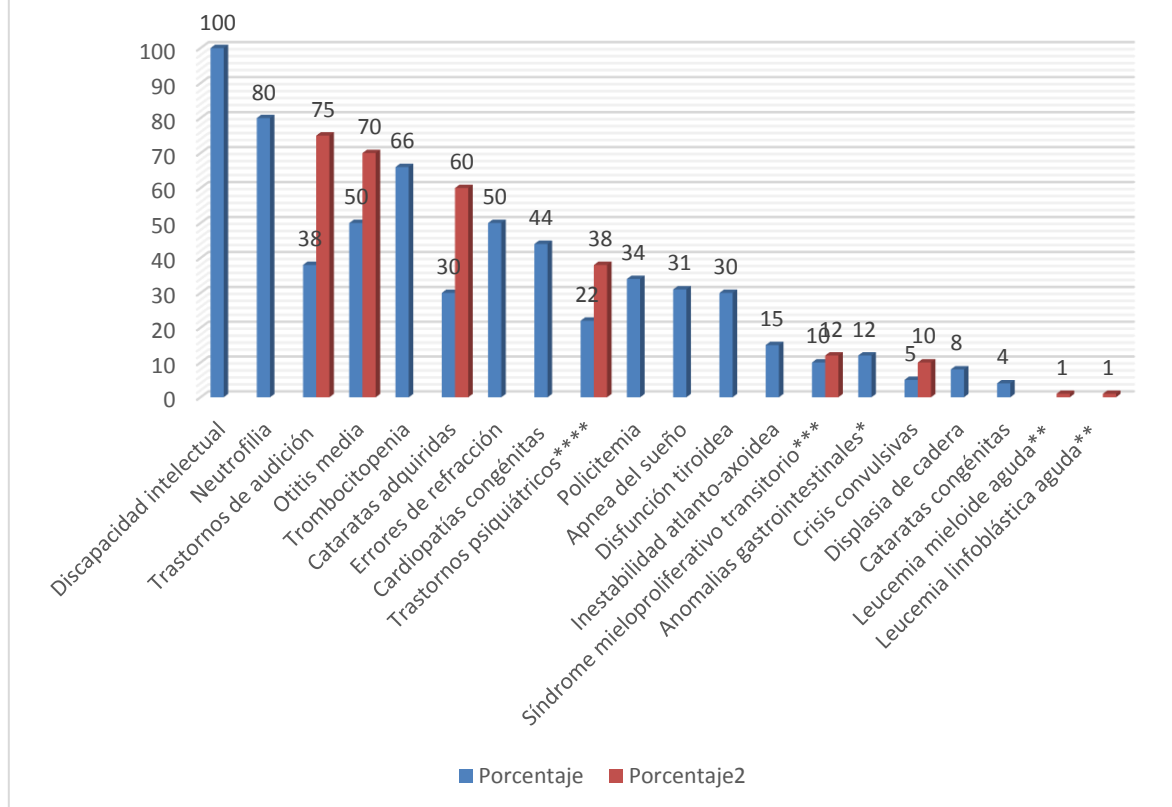


Figura 1.- Gráfica de barras que ejemplifica las complicaciones más comunes presentes en SD

* Hirschprung es la más frecuente

** de 10 a 20 veces más que población en general

*** 70 a 90% de los casos se resuelven solos

**** aumentan a partir de los 35 años

(Adaptado de 10, 11 y 13)

2.6 Asesoramiento genético

El asesoramiento genético que reciben los padres en el momento del diagnóstico, ya sea prenatal o en el momento del nacimiento del producto, es de gran importancia ya que la información que reciben y del modo en que se les

orienta será determinante para las decisiones y acciones que tomen ellos y sus familias, así como para informar acerca del riesgo de recurrencia.(12)(tabla 5)

Tabla 5 **RIESGO DE RECURRENCIA EN SUCESIVOS EMBARAZOS SEGÚN EL CARIOTIPO DEL PACIENTE AFECTADO CON SÍNDROME DE DOWN**

HIJO ANTERIOR	CARIOTIPO		RIESGO DE RECURRENCIA
	PADRE	MADRE	
Trisomía	Normal	Normal	Algo más elevado que un embarazo sin SD en una madre de igual edad
Mosaico	Normal	Normal	Bajo (¿)
Translocación	Normal	Normal	1%-2%
	21/D	Normal	<2%
	Normal	21/D	10-15%
	21/22	Normal	<2%
	Normal	21/22	33%
	21/21	Normal	100%
	Normal	21/21	100%

Asociación Española de Pediatría (Mercé Artigas López) 1998

2.7 Diagnóstico prenatal

El diagnóstico prenatal (DP) contempla todas aquellas acciones prenatales que tienen por objeto la detección y/o el diagnóstico de un defecto congénito, entendiendo como tal toda anomalía en el desarrollo morfológico, estructural, funcional o molecular presente al nacer, externa o interna, familiar o esporádica, hereditaria o no, única o múltiple. En el ámbito de prevención de las cromosomopatías, la trisomía 21 o SD ha sido uno de los objetivos prioritarios por ser la aneuploidía más frecuente en nacidos vivos y la causa más común de retraso mental severo, al tratarse el SD de una alteración cromosómica que tiene lugar durante la concepción o muy poco después de ella, las modernas técnicas han permitido diagnosticar el SD durante la etapa fetal.(13,14). El DP constituye una necesidad creciente, ya que actualmente en países desarrollados el promedio de edad de embarazo es de 35 años y como se mencionó anteriormente la edad materna es un factor de riesgo importante para SD. Por lo anterior las parejas demandan el DP para conocer el estado del producto de la gestación con la

oportunidad de tomar una decisión acerca de la continuación del embarazo en caso de que el feto presentara esta afección.

El DP se basa en el análisis de ciertos factores bioquímicos maternos, biométricos del feto y biopsia fetal. Estos análisis pueden clasificarse en métodos no invasivos o de tamizaje, y en invasivos o confirmatorios, propiamente diagnósticos los últimos.

2.7.1 Métodos no invasivos

Los métodos no invasivos de diagnóstico prenatal son pruebas exploratorias o de cribado que presentan la ventaja de no ser agresivas y dan alerta para poder dar un diagnóstico oportuno. En este momento la evaluación del riesgo se limita a aneuploidías fetales específicas (trisomía 13, 18 y 21). Algunas plataformas criban también anomalías de cromosomas sexuales. Aproximadamente el 50% de las anomalías citogenéticas identificadas de forma rutinaria mediante amniocentesis no serán detectadas si solo se criban trisomía 21, 18 y 13.(13,15). Las pruebas de tamizaje se dividen en dos: análisis ecográficos y análisis bioquímicos.(13).

2.7.1.1 Marcadores ecográficos

Dentro de las técnicas de cribado prenatal no invasivo la ecografía es uno de los más importantes. Esta técnica se realiza con un transductor que emite ondas de sonido de alta frecuencia hacia las estructuras corporales, para luego captar el eco que provocan reconstruyendo la señal en imágenes digitales. El objetivo de esta técnica es rastrear indicadores (marcadores ecográficos) hacen sospechar que el feto estudiado pudiera presentar SD. Dentro de estos marcadores destacan dos principales por su sensibilidad y especificidad: la translucencia nuchal (TN), que es un marcador primario descrito como una zona anecoica subcutánea entre la piel y los tejidos blandos que rodean la columna

cervical(19) que se debe a la acumulación de líquido subcutáneo en la nuca del feto, este se considera anormal si mide más de 3 mm, en primer trimestre y en segundo trimestre mayor a 5 mm, posterior a las 18 SDG (semanas de gestación) se llamará pliegue nucal (PN), aunque la TN no es específica para SD, ya que puede aparecer con otros trastornos cromosómicos, monogénicos o multifactoriales, se considera el más sensible y específico, con una sensibilidad de 15%, especificidad de 97%, un valor predictivo positivo de 8% y valor predictivo negativo de 99% cuando es mayor a 5 mm (20); el otro marcador importante es la presencia o no de osificación del hueso de la nariz fetal; si el hueso no está formado a las doce semanas es más probable que se trate de un feto con SD y aunque no es específico se encuentra entre 60 a 73% de los fetos con SD contra 0.5-3% de los fetos euploides (21), en caso de estar ausente presenta una sensibilidad de 29%, especificidad de 99%, valor predictivo positivo de 36% y valor predictivo negativo de 99%, mientras que su hipoplasia presenta una sensibilidad de 47%, especificidad de 94%, valor predictivo positivo de 8% y valor predictivo negativo de 99% (20). Ante la presencia de estos dos marcadores así como otras alteraciones estructurales del feto se debe sospechar de SD. Esta prueba debe ser realizada por personal con experiencia y con un equipo emisor y receptor de alta resolución. La prueba se puede realizar muy tempranamente en el embarazo (10-12 SDG).

2.7.1.2 Marcadores bioquímicos

Los marcadores bioquímicos son considerados como otro de los métodos de tamizaje prenatal para la detección de SD. Se basan en la determinación en suero materno de una serie de sustancias bioquímicas de origen fetal o placentario. Estos marcadores deben ajustarse según la edad gestacional ya que son distintos los marcadores empleados para el análisis dependiendo de la edad en que se realicen así como también para la población estudiada. En el primer trimestre el estudio que se realiza es la valoración de los niveles en suero materno de la PAPP-A (Pregnancy Associated Placental Protein – A) y el nivel de la

fracción β libre de la HCG (Hormona Gonadotropina Coriónica). Este análisis se debe realizar entre las 8 y 12 SDG. Los valores se expresan en términos absolutos, pero para su ponderación informática se han de transformar en valores relativos, los MoM (Multiples of the Median). En el SD, la PAPP-A se encuentra por debajo de 0,4 MoM mientras que la β hCG se incrementa por encima de 2-2.5 MoM.

Para aumentar su precisión, el tamiz de primer trimestre puede complementarse con los valores de TN medidos en MoM en la ecografía siendo para SD valores entre 1.8 a 2 MoM. Logrando así una detección de 75% hasta 83% de los casos tomando en cuenta la edad materna, con una tasa de falsos positivos de 3%, a esta estrategia se le conoce como tamiz combinado.

En el cribado de segundo trimestre la extracción de sangre materna ha de realizarse entre las 14 y 17 SDG por medición ecográfica, de preferencia en la 15-16. En este caso se sustituye la PAPP-A por los niveles de α -FP (alfa feto proteína) y se medirá la hCG total, además de niveles de estriol libre. Los valores normales de α -FP en mujeres embarazadas que tienen entre 15 a 17 SDG son: 19-75 UI/ml, 124 ng/ml, 124 mcg/l o bien de 0,4 a 2,5 MoM; en SD la α -FP se verá menor a esos niveles, mientras que el valor de hCG se elevará sobre 0,4 a 2,5 MoM; por último el estriol libre o no conjugado presenta valores normales 0,5 a 1 MoM y su descenso indica riesgo para presentar de SD. Valores de α -FP mayores a 3 MoM son además altamente sugestivos de defectos de tubo neural.

De las 16 a las 18 SDG se puede agregar a estos marcadores la Inhibina A que cuando sus valores son mayores de 2,5 MoM aumenta la sospecha de SD. El índice de detección oscila entre 60 a 75% con falsos positivos de 5 a 3% de los casos, dependiendo de los marcadores utilizados.

Los marcadores séricos no sustituyen la utilidad del examen ecográfico del primer trimestre, que ha demostrado ser muy útil para señalar con exactitud la

fecha gestacional, evaluar la translucencia nuchal que identifica a un feto con mayor riesgo de presentar anomalías cromosómicas, identificar gemelos y embarazos de mayor grado, anomalías placentarias y anomalías mayores. En combinación los marcadores ultrasonográficos y séricos de primer y segundo trimestres presentan una detección del 87% con 1.9% de falsos positivos.(12,13,14,18). A continuación se enlistan las diferencias entre los métodos de tamizaje (Tabla 6).

Tabla 6 TABLA COMPARATIVA DE MÉTODOS NO INVASIVOS (ECOGRÁFICOS Y BIOQUÍMICOS)

Prueba	Edad gestacional	Marcador	Valores normales	Valores en SD	% Detección	% Falsos positivos
Ecografía	10-12 sdg	TN y hueso nasal	1.8 - 2 MoM y presencia de hueso nasal	>2 MoM y ausencia de hueso nasal	60	5
Ecografía + Edad materna	10-12 sdg	TN y hueso nasal	1.8 - 2 MoM y presencia de hueso nasal	>2 MoM y ausencia de hueso nasal	70	5
Doble marcador	8-12 sdg	PAPP-A y (fβhCG)	0,4 MoM y 2-2.5 MoM	<0,4 MoM y >2.5 MoM	75	5
Cribado combinado	8-12 sdg	PAPP-A, (fβhCG) y TN	0,4 MoM, 2-2.5 MoM y 1.8 - 2 MoM	<0,4 MoM, >2.5 MoM y >2 MoM	75	3
Cribado combinado + Edad materna	8-12 sdg	PAPP-A, (fβhCG) y TN	0,4 MoM, 2-2.5 MoM y 1.8 - 2 MoM	<0,4 MoM, >2.5 MoM y >2 MoM	83	3
Triple marcador	14-17 sdg	α-FP, fβhCG y estriol	0,4 a 2,5 MoM, 0,4 a 2,5 MoM y 0,5 a 1 MoM	<0,4 MoM, >2,5 MoM y <0,5 MoM	60	5
Triple marcador + TN + Edad materna	14-17 sdg	α-FP, fβhCG, estriol y TN	0,4 a 2,5 MoM, 0,4 a 2,5 MoM, 0,5 a 1 MoM y 1.8 - 2 MoM	<0,4 MoM, >2,5 MoM, <0,5 MoM y >2 MoM	71	3
Cuadruple marcador	16-18 sdg	α-FP, fβhCG, estriol e inhibina A	0,4 a 2,5 MoM, 0,4 a 2,5 MoM, 0,5 a 1 MoM y 2.5 MoM	<0,4 MoM, >2,5 MoM, <0,5 MoM y >2.5MoM	75	3
Cuadruple marcador + Edad materna	16-18 sdg	α-FP, fβhCG, estriol e inhibina A	0,4 a 2,5 MoM, 0,4 a 2,5 MoM, 0,5 a 1 MoM y 2.5 MoM	<0,4 MoM, >2,5 MoM, <0,5 MoM y >2.5MoM	75	3
Test integrado	Primero y segundo trimestre	Cribado combinado + multiple marcador +	0,4 MoM, 2-2.5 MoM y 1.8 - 2 MoM + 0,4 a 2,5	<0,4 MoM, >2.5 MoM y >2 MoM + <0,4	88-96	5

		edad materna	MoM, 0,4 a 2,5 MoM, 0,5 a 1 MoM y 2.5 MoM	MoM, >2,5 MoM, <0,5 MoM y >2.5MoM		
Edad materna	Primero y segundo trimestre	Edad materna			44	16

2.7.1.3 DNA libre fetal

Desde 1969 se conoce la existencia de células fetales en circulación materna por linfocitos con cromosoma Y fetal, pero no es hasta 1993 cuando Hamada y cols. logran desarrollar técnicas de detección por PCR cuantitativa con la finalidad de utilizarlas para diagnóstico prenatal no invasivo y aunque su especificidad es alta, su baja concentración en sangre materna constituye un alto costo, dificultad de análisis y tiempo por lo que no es confiable aun ofertarlo como prueba (22).. En 1997 Lo et al. sugieren una alternativa a partir de la detección de DNA libre (extracelular) de origen fetal en suero de mujeres embarazadas, proponiéndolo como una opción de diagnóstico prenatal no invasivo. A la fecha la inhabilidad de discriminar adecuadamente las diferencias entre el DNA fetal y el materno por PCR considera un impedimento diagnóstico (22) sin embargo actualmente es ofertado comercialmente para determinación de sexo fetal, determinación de Rh fetal y diagnóstico de enfermedades monogénicas pero con respecto a las aneuploidías fetales aún se considera como una prueba de tamizaje.(16,17).

Se ha descrito la presencia de DNA libre fetal (DNAfl) en plasma materno a partir de la quinta semana de gestación. La concentración de DNA total aumenta significativamente durante el embarazo, sin embargo, la concentración de DNAfl es tan sólo un 5-7 % del ADN total en sangre materna. El ADN fetal es más pequeño que ADN el materno, lo que facilita su identificación. Tras el parto, el DNAfl desaparece de la circulación materna en cuestión de minutos. La liberación del DNAfl es por medio de apoptosis de células fetales en sistema circulatorio materno aunque se cree que no es el único mecanismo ya que se ha observado una correlación con la edad gestacional y con la concentración de hCG-β. Estas

pruebas se basan en una extracción de sangre materna y posterior análisis del DNAfl por medio de secuenciación de nueva generación (NGS).(12,18).

Aunque varios estudios describen un aumento de la concentración del DNAfl en gestantes con fetos con SD, los resultados obtenidos son contradictorios. Se observa un solapamiento en las concentraciones totales de DNAfl de las gestantes portadoras de fetos con y sin SD incluso se ha descrito una disminución de DNAfl en algunos casos de embarazos con SD. La técnica más comúnmente utilizada es un análisis de proporciones alélicas en donde se establece la cantidad entre los alelos de un locus heterocigótico localizado en el cromosoma de interés, en este caso el cromosoma 21. La proporción alélica para dicho locus será 1:1 para un feto euploide, pero 2:1 o 1:2 para un feto con SD. Una variante de esta técnica es el análisis de la dosis cromosómica relativa que permite establecer la ratio entre un locus del cromosoma de interés (21) y otro de referencia localizado en otro cromosoma distinto. Esta razón entre moléculas de ácidos nucleicos fetales debería ser 2:2 para un feto euploide y 3:2 para SD. (18,19)

A pesar de ser una técnica excelente para detección de sexo fetal, presenta algunas desventajas con respecto al cribado de SD. ya que el principal problema es la dificultad del aislamiento del DNAfl debido a que es más fragmentado que materno (80% menor a 200 pb) y a un exceso de DNA materno libre favoreciendo la contaminación de la muestra, actualmente se considera un índice de detección de 99.2% con una tasa de falsos positivos de 0.09%(22).

2.7.1.4 Proteómica

La proteómica es el estudio de las proteínas en particular de su estructura y función, el proteoma es la totalidad de proteínas expresadas por un genoma en un momento dado y bajo determinadas condiciones de tiempo y ambiente. Cualquier cambio en una proteína que está fuertemente asociada con una enfermedad tiene el potencial de ser un biomarcador siendo este el objetivo principal de la

proteómica clínica. Existen varias técnicas para analizar globalmente el proteoma y separar sus proteínas entre las cuales se encuentran DIGE (Difference in gel electrophoresis), ICAT (Isotope coded affinity tags), MudPIT (Multidimensional protein identification technology). Para posteriormente realizar una identificación de proteínas se utilizan varios métodos como el MALDI-TOF (Matrix-assisted laser desorption/ionization Time of flight), SELDI-TOF-MS (Surface Enhanced laser desorption ionization time of flight mass spectrometry) y UPLC MS/MS (Ultra Performance Liquid Chromatography).

La técnica de UPLC MS/MS combina la separación física de la cromatografía líquida con la capacidad de análisis de un espectrómetro de masas, la cromatografía líquida puede separar metabolitos que no son volátiles y no han sido derivatizados, por lo que le confiere gran ventaja sobre la cromatografía en fase gaseosa, al acoplarse a la espectrometría provee un método ideal para la detección de metabolitos desconocidos.

El equipo utilizado en este estudio consta de una consola con cuatro partes principales, un par de bombas encargadas de administrar los solventes que pueden ser manejados para incrementar la eficiencia de separación y reducir el tiempo de retención, un administrador de muestras que consta de un plato con temperatura ajustable para viales de 2 ml, columnas de UPLC divididas en fase normal y fase reversa ambas con sus fases rígidas y móviles, estas columnas llevan solventes tanto polares como no polares según se desee, los detectores y por último un espectrómetro de masas en tándem en el cual, por medio de una aguja, se carga la muestra a un espacio a presión atmosférica hacia una fuente ionizante, que ioniza la muestra haciéndola pasar por una serie de orificios para luego ser filtrados según su relación masa carga (m/z) hacia un primer cuadrupolo, luego los iones separados por masa entran a una celda de colisión para inducir su descomposición; estos fragmentos son nuevamente filtrados por su relación masa carga en un segundo cuadrupolo para finalmente ser detectados y digitalizados para su interpretación. (19)

2.7.2 Métodos invasivos

Son pruebas diagnósticas que requieren de técnicas cuya finalidad es obtener una muestra de tejido fetal, aunque son múltiples los tejidos fetales que se pueden obtener, los que por su accesibilidad son más fáciles de conseguir son la placenta o corion y el líquido amniótico.(13).

2.7.2.1 Biopsia de vellosidades coriales

La biopsia de vellosidades coriales (BC) consiste en la obtención de una muestra de corion, que es el tejido que posteriormente constituirá la placenta y dado que procede de la misma célula original que el feto, contiene la misma información genética. La BC debe ser realizada entre la semana 10 y 13 de gestación, por medio de una sonda guiada por ultrasonido a través de abdomen o vía vaginal, se toma una cantidad de 15 ± 6 mg de tejido para realizar un estudio de cariotipo que tarda 2 a 7 días en un análisis directo y 12 a 15 días en cultivos, y 24 hs si se realiza una técnica citogenética llamada Hibridación por fluorescencia in situ (FISH). Su ventaja principal es la precocidad en el diagnóstico. Como desventajas, la BC puede producir pérdidas gestacionales en el 1% de los casos debido a perforación de la bolsa amniótica que conduzca a una posterior infección y hemorragia, del 1 a 3% de los casos pasarán como falsos negativos debido a que pueden ser mosaicos y en 0.5 % de los casos puede presentarse contaminación materna, además que se ha descrito reducción de miembros con riesgo absoluto de 0.20 % en menores o iguales a 9 SDG, 0.10% a las 10 SDG y 0.05% a las 11 SDG (23). Se puede practicar a cualquier embarazada con algún estudio de tamizaje de primer trimestre positivo. La práctica de una biopsia corial puede incrementar los valores de la alfafoproteína (α FP) en suero materno y se

recomienda esperar un mínimo de 2 semanas para la determinación sérica de la α FP.(13,14)

2.7.2.2 Amniocentesis

La amniocentesis es otra de las técnicas invasivas que consiste en la obtención de células epiteliales fetales como piel, tracto digestivo, respiratorio y urinario además de amniocitos, a través de una muestra de líquido amniótico, para posteriormente realizar un estudio citogenético que representará el complemento cromosómico del feto en estudio. La vía de acceso al líquido es por una punción abdominal guiada por ecografía, para la colección de una muestra de 15 a 20 ml dando resultado entre 24 a 48 hrs por medio de FISH realizado en interfase o entre 12 a 18 días por cariotipo bandas GTG en metafase. Este procedimiento se puede realizar a partir de la 15 SDG debido a que antes de esta semana gestacional la cantidad de líquido es muy poca y como máximo hasta las 22 SDG debido al tamaño fetal en esa etapa gestacional que aumentaría el riesgo de lesión al producto, así como la posible reactividad uterina que desembocaría en parto pretérmino. También es importante mencionar que conforme avanza la edad gestacional disminuye el número de células suspendidas en el líquido viables para un cultivo celular que ofrezca un resultado en cariotipo. La amniocentesis presenta una certeza diagnóstica superior al 99 %, como desventajas ocasiona pérdidas gestacionales entre 0.5% a 1% de los procedimientos inclusive en personal experto, además de que incrementa el riesgo de pérdida fetal propia del embarazo en unos días posteriores al procedimiento, esta técnica presenta 0.25% de falsos negativos debido a mosaicos y en menos de 0.5% de los casos puede ocurrir contaminación materna de la muestra.(13,14)

2.7.2.3 Cordocentesis

La cordocentesis es un método que se reserva a casos excepcionales como en mujeres de edad avanzada con alta sospecha de cromosomopatía fetal que no tuvieron algún tipo de tamizaje de primer o segundo trimestre. O bien, cuando no puede obtenerse líquido amniótico debido a su poca o nula producción (oligoamnios, anhidramnios, respectivamente), también se recurre a esta técnica cuando hay necesidad de corroborar el diagnóstico en tercer trimestre a causa de un resultado fallido en un estudio previo, o en caso de duda cuando el resultado obtenido es un mosaico. Consiste en la punción del cordón umbilical a través de la pared abdominal de la madre, para la obtención de sangre fetal. En comparación con los otros métodos, el riesgo de pérdida fetal es superior, situado en el 3% incluso cuando la punción se realiza en un centro especializado. Esta prueba no se recomienda hacerla antes de las 20 SDG; los resultados pueden ser valorables en menos de 7 días. (13,14).

En el 2007 la ACOG (American Congress of Obstetricians and Gynecologists) realizó una publicación donde menciona que para la realización de los métodos de diagnóstico prenatal invasivos se debe evaluar individualmente el riesgo

-beneficio, además estipula la oferta de estos procedimientos a toda mujeres con un riesgo incrementado de presentar un feto con alguna trisomía a consecuencia de: una edad materna de riesgo (> 35 años), antecedentes personales o familiares de aneuploidías, o en los resultados de una prueba de tamizaje prenatal de primero o segundo trimestre sugestiva de aneuploidía.(15)

2.8 Proteómica vs otros biomarcadores

Tabla 7 TABLA COMPARATIVA ENTRE MÉTODOS NO INVASIVOS

Técnica	Edad gestacional	Marcador	% Detección	% Falsos positivos	Costo MNX*	Ventajas	Desventajas
Edad materna	Primero y segundo trimestre	Edad materna	44	16	No	Sin costo	Por si solo tiene un índice de detección muy bajo
Ecografía	Primero y segundo trimestre	TN y hueso nasal	60	5	1,200-1,500	Ningún riesgo materno-fetal, accesible	Requiere personal entrenado Por sí solo no es tan efectivo
Marcadores bioquímico	Primero y segundo trimestre	PAPP-A, (fβhCG), α-FP, fβhCG, estriol e inhibina A	88	5	2,500	Alta disponibilidad, fácil realización e interpretación	Se requieren al menos dos estudios para aumentar su detección Es dependiente de USG
DNAf	Primero y segundo trimestre	DNA libre fetal	>95	<1	19,500	Es detectable desde etapas muy tempranas del embarazo	Se requiere personal altamente capacitado Difícil de aislar
Proteómica	Primero y segundo trimestre	Proteínas	>95	<1	5mil**	Alta disponibilidad de muestra, económico	Se requiere personal altamente capacitado Variabilidad del proteoma

*Costos tomados de laboratorios de monterrey NL

**Costo estimado a partir del costo de los reactivos, la reacción incluye 4 muestras, una vez estandarizado el costo puede reducirse hasta 200 pesos por una prueba de ELISA (*Enzyme linked immunoSorbent Assay*)

La principal ventaja de DNAfl y la técnica proteómica sobre los demás métodos no invasivos es el mayor porcentaje de detección y el menor porcentaje en falsos positivos; la diferencia entre estas, a pesar de que ambas dependen de personal capacitado y equipo especializado, es que la primera se basa en la búsqueda de material ajeno a la madre, en este caso DNAfl, y por lo tanto depende de la cantidad disponible en la circulación materna y la calidad en la cual se preserve, mientras que la otra no depende de búsqueda intencionada de material ajeno, ya que se basa mostrar las diferencias fisiológicas o patológicas en un tiempo específico por medio del análisis del proteoma y así comparar el proteoma de una mujer embarazada con un feto con SD contra el proteoma de referencia y así encontrar diferencias cualitativas y cuantitativas para la obtención de biomarcadores. Actualmente las técnicas de detección de DNAfl son ofrecidas directo al consumidor como parte de un tamizaje para aneuploidías y síndromes de microdeleción, esto nos demuestra la gran importancia que representa el diagnóstico prenatal por lo que ofrecer alternativas a esta necesidad; el establecimiento de un proteoma de referencia de condiciones fisiológicas específicas nos permitirá en un futuro no solo comprender más a fondo la fisiopatología de los padecimientos por medio del interactoma, sino también estandarizar técnicas de detección específicas y sencillas de implementar en el laboratorio, como el ensayo de ELISA (*Enzyme-linked Immunosorbent Assay*) en busca de ciertos péptidos validados haciendo más eficaz a final de cuentas tiempo y costos en el terreno del diagnóstico prenatal.

2.9 Antecedentes en proteómica

Estudios anteriores como el de Nagalla *et al* (2007) en el que realizaron un análisis proteómico para identificar potenciales biomarcadores séricos para detectar Síndrome de Down (SD), en muestras de mujeres en 1° y 2° trimestres del embarazo utilizando tecnología 2D-DIGE y 2D-CF, con MudPIT;LC/LC-MS/MS e identificación del perfil de péptidos por MALDI-TOF-MS. Este grupo reportó 28 proteínas potenciales (24). Kolialexi *et al* (2011) realizaron un estudio en 12

gestantes del segundo trimestre, con fetos con SD y reportaron una lista de 9 potenciales biomarcadores, utilizando un análisis basado en 2-DE y el equipo MALDI-TOF-MS (25). Koster *et al.* (2009) analizaron 14 muestras de suero de mujeres con embarazos con feto con SD y 15 controles usando placas basadas en inmunoensayos multiplexados para 90 diferentes analitos; resultando en la identificación de 7 potenciales biomarcadores (26). Medina-Aguado *et al* (2013) ha descrito un método reproducible mediante UPLC para determinar el perfil proteómico de la mujer embarazada con feto aneuploide analizando a la par muestras séricas de mujeres sanas no embarazadas y embarazadas con feto euploide, y se han encontrado algunos péptidos que pudieran ser biomarcadores para la detección prenatal de SD.

La finalidad de este estudio es la reproducción del método establecido por Medina-Aguado *et al*, y en base a los biomarcadores encontrados en embarazos con feto con SD, observar las diferencias entre estos casos contra mujeres con embarazo con feto sano por ultrasonido y mujeres no embarazadas, con la finalidad de ofrecer un método de tamizaje neonatal alternativo a los establecidos hasta la fecha.

2.10 Justificación

El SD es la aneuploidía más frecuente en nacidos vivos, y la causa genética más frecuente de discapacidad intelectual; ante el aumento de mujeres embarazadas en edad de riesgo ha surgido la necesidad de desarrollar biomarcadores específicos para la detección de SD durante el embarazo. A la fecha los métodos diagnósticos disponibles son invasivos y conllevan un riesgo para el binomio madre-feto por lo que es importante el desarrollo de nuevas técnicas de tamizaje seguras, cuantificables, confiables que compitan con las ya establecidas para así ofrecer una alternativa a estas pacientes en riesgo de presentar un embarazo con SD para brindar una detección oportuna y un asesoramiento genético adecuado.

CAPITULO III

3 HIPOTESIS

3.1 Hipótesis de investigación

Existe diferencia entre el proteoma materno de embarazos con feto con SD, con feto sin SD y el de mujeres no embarazadas

3.2 Hipótesis nula

No existe diferencia entre el proteoma materno de embarazos con feto con SD, con feto sin SD y el de mujeres no embarazadas.

CAPITULO IV

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo general:

Determinar el perfil proteómico en suero materno, buscando los biomarcadores descritos por Medina-Aguado y *col/s.* en el diagnóstico prenatal de SD no invasivo; y realizar cuantificación de los mismos compararlo con el grupo control embarazadas con feto sano por ultrasonido con las mujeres con feto con SD utilizando para validación el grupo de mujeres no embarazadas empleando el equipo “Micromass Q-TOF premier” con UPLC y una fuente de ionización electrospray de Waters.

4.2 Objetivos específicos:

- Demostrar la reproductibilidad del método descrito previamente por Medina-Aguado y *cols.*
- Demostrar diferencias entre el perfil proteómico de la mujer embarazada con feto con SD, de la mujer embarazada con feto sano por ultrasonido y de la mujer sana no embarazada.
- Proponer biomarcadores cuantificables para la detección no invasiva de SD.

- Ofrecer asesoramiento genético a los grupos de mujeres embarazadas específico para cada caso particular.

CAPITULO V

5 MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Tipo de estudio

- Observacional
- Transversal
- Comparativo
- Casos y Controles

5.2 Grupos de estudio

- Un grupo de 10 embarazadas con feto sano por ultrasonido
- Un grupo de 9 embarazadas con feto con SD.
- Un grupo de 10 mujeres sanas no embarazadas.

5.3 Criterios de inclusión.

5.3.1 Casos

- Mujeres en el 2° trimestre del embarazo con sospecha prenatal por hallazgos ultrasonográficos y/o marcadores bioquímicos de feto con SD, que lleven control prenatal. Que aprueben su participación con su firma en el consentimiento informado.

5.3.2 Controles

- Mujeres embarazadas con feto sano por ultrasonido, en el 2° trimestre, que lleven control prenatal médico y ultrasonográfico; y que autoricen bajo consentimiento informado su participación en el estudio.
- Mujeres no embarazadas, sanas equiparadas en edad y raza con el grupo de estudio y el grupo control de embarazadas. Que autoricen su participación, bajo firma de consentimiento informado.

5.4 Criterios de exclusión

- Presencia de patología placentaria.
- Mujeres con enfermedad crónica o aguda al momento del estudio.
- Evidencia ultrasonográfica de múltiples malformaciones fetales no relacionadas con SD.
- Embarazo múltiple.
- Exposición a teratógenos.

5.5 Criterios de eliminación

- Muestra sanguínea insuficiente o en malas condiciones.
- Mujeres que retiren su consentimiento informado para participar en el estudio.
- Mujeres sin reporte ultrasonográfico físico que describa las alteraciones.
- Mujeres cuyo historial clínico y datos demográficos estén incompletos.

5.6 Descripción del diseño

Se diseñó un procedimiento de operación estándar para la recolección y procesamiento de muestras de sangre con esto contribuyendo a la reproducibilidad del mismo, la separación inmediata del suero de los elementos celulares, los parámetros para el almacenamiento y proceso fueron estandarizados ya que son variables críticas para la veracidad de los datos obtenidos.

5.6.1 Recolección de la muestra

Se recibieron pacientes del servicio de Ginecología y Obstetricia del Hospital Universitario Dr. José Eleuterio González y otras instituciones estatales tanto públicas como privadas que cumplieron con los criterios de inclusión a las cuales se les ofreció una consulta de diagnóstico prenatal, se invitaron a participar en el estudio y previa firma del consentimiento informado se recolectaron 5 ml de sangre periférica de las pacientes de los tres grupos en tubo sin anticoagulante (tapa roja) en la sala de toma de muestras del departamento de Genética de la misma institución de salud, siempre y cuando cumplieran con las condiciones de un ayuno mínimo de cuatro horas, no estuvieran consumiendo medicamentos, o presentaran alguna enfermedad.

5.6.2 Almacenamiento de la muestra

La muestra de sangre recolectada se transportó dentro de las primeras cuatro horas posterior a su toma al laboratorio de proteómica de las instalaciones anteriormente mencionadas para una centrifugación a 2500 rpm a 25°C durante 15 minutos para posteriormente extraer el suero, colocarlo en tubos Eppendorf cónicos de 2 ml y agregarle inhibidor de proteasas para su conservación, posteriormente se congeló durante una hora a -20°C para luego pasar a -70°C para su almacenamiento.

Equipo

- Centrifuga Beckman Coulter Allegra™ refrigerada

Material

- Jeringas de 10ml
- Tubos de ensayo desechable, sin aditivo
- Pipetas Pasteur de vidrio de 9"
- Microtubos Eppendorf cónicos de 2ml

5.6.3 Dilución y depleción de albúmina/IgG

La muestra congelada a -70°C debe ser descongelada para posteriormente diluir 25 μl de suero con 75 μl de buffer PBS (50mM NaH_2PO_4 ; 150mM NaCl, pH 7.2), esta dilución se mezcla por vórtex y se cuantifica la concentración de proteínas de cada muestra usando el espectrofotómetro de NanoDrop^R ND-1000, de espectro completo (220-750nm) utilizando 2 μl de la mezcla. La medición se llevó a cabo usando la aplicación de análisis de proteínas purificadas A280, este método es aplicable a proteínas purificadas que presenten absorbancia a 280 nm calculando su concentración en mg/ml.

El espectrofotómetro NanoDrop^R ND-1000, mide con precisión una muestra de proteínas por arriba de 100mg/ml (albúmina sérica bovina) sin dilución. Para hacer esto, el instrumento automáticamente detecta la alta concentración y utiliza la longitud de recorrido de 0.2 mm para calcular la absorbancia.

Posterior a esta medición se centrifugó brevemente la columna de depleción por giro Qproteome a 500 x g, luego se estabiliza con dos alícuotas de 500 μl de PBS el cual, luego de retirar la tapa inferior, se decanta por gravedad; al terminar se coloca un tapón y se cargan 100 μl de la muestra diluida, se coloca la tapa de rosca y se mezcla vigorosamente, posteriormente se deja incubar por 10 minutos a temperatura ambiente con agitación por inversión, luego la muestra es transferida por goteo por gravedad a un nuevo tubo Eppendorf de 2 mL nuevo, acto seguido se realizan dos lavados con 100 μl de PBS y se colecta, siendo el último con spin para lograr un drenaje completo. Posterior a la colecta se mezcla el filtrado por vórtex y se cuantifican nuevamente las proteínas totales por medio del espectrofotómetro teniendo en cuenta que habrá en promedio una remoción

del 80% del total de las proteínas, las cuales corresponden a la albúmina e Ig/G por su tamaño.

Equipo

- NanoDrop^R ND-1000
- Micropipeta de 0.5-10µl

Material

- Puntas 10µl
- Toallas absorbentes Kimwipes

Reactivos

- Agua libre de proteasas
- PBS

5.6.4 Diafiltración y concentración de proteínas

En este proceso se acondiciona una membrana de 10 kDa o 3 kDa con 100 µl de bicarbonato de amonio (NH_4HCO_3) a 100mM y se centrifuga a 5,000 g por 3 minutos (en caso de ser membrana de 3 kDa 30-60 minutos) posteriormente se carga la muestra en la membrana para luego centrifugar a 5,000 g por 15 a 20 minutos a temperatura ambiente (en caso de ser membrana de 3 kDa 2-2.5hrs) procurando que no se seque la membrana ya que puede fraccionarse y hacer inservible la muestra; posteriormente se realizan dos lavados con bicarbonato de amonio 100 mM, resuspendiendo ambas veces; luego se centrifuga 5 minutos (para membrana de 3 kDa 1hr). Acto seguido, se recupera la muestra en 4 fracciones de 25 µl de bicarbonato de amonio 100 mM, colocándola en un nuevo tubo, nuevamente luego de homogeneizar la muestra, se realiza una lectura con el espectrofotómetro a 280 nm y se ajusta la concentración a 1.0mg/ml.

Se utilizan preferentemente membranas de filtración de 10 kDa ya que es el es útil para la detección de péptidos de 100 aminoácidos ideales para la investigación proteómica; dichos filtros consisten en membranas de celulosa

regenerada con una unión a 10,000 Da de límite de peso molecular nominal, que es la capacidad de retención de moléculas

Equipo

- NanoDrop[®] ND-1000
- Micropipeta de 0.5-10µl
- Micropipeta de 100-1000µl
- Membrana de centrifugado 10kDa
- Centrifuga Eppendorf[®] 5415C

Material

- Puntas 10µl
- Toallas absorbentes Kimwipes

Reactivos

- Bicarbonato de amonio 1M

5.6.5 Digestión por tripsina

Una vez ajustada la muestra, se toman 100 µl de muestra que equivale a 100 µg de proteína, esta muestra es sometida a una serie de pasos para su preparación y digestión, siendo el primero una reducción, en donde se agregan 5 µl de DTT (Ditiotreitol) a 200mM, se coloca en el vórtex para homogeneizar y se incuba a 65°C por 45 minutos a una hora; el siguiente paso es la derivatización en el que se agregan 4 µl de iodoacetamida a 1M y se incuba por 45 minutos a temperatura ambiente en oscuridad, esta reacción debe detenerse agregando 20 µl de DTT y dejando incubar por 45 minutos a una hora a temperatura ambiente.

Una vez derivatizada la muestra, sigue su digestión, para ello se prepara la tripsina grado secuenciación, tomando 20 µl de buffer de fábrica al vial de tripsina y se resuspende por pipeteo, posteriormente se coloca a 37°C por 15 minutos en baño maría esto con la intención de activar la acción de la enzima; enseguida se agregan 5 µl de tripsina de grado secuenciación preparada (concentración de 1.0 µg/µl normalmente se utiliza en una relación 1:20-50 de tripsina/proteína), acto

seguido se vuelve a hacer vórtex a la muestra y se incuba por 24 hs a 37°C en baño maría, terminado el tiempo se procede con centrifugación de la muestra a 12,000 rpm por 15 minutos a temperatura ambiente para observar si hay precipitado (el precipitado puede provocar que las columnas y las tuberías del espectrómetro se bloqueen), por último se agregan 10 µl del estándar MassPrep MIX 1, se homogeneiza la muestra y se colocan 100 µl de muestra en un vial de recuperación total con tapa pre cortada.

Equipo

- Micropipeta de 0.5-10µl
- Membrana de 10kDa
- Termociclador Eppendorf^R
- Centrifuga Eppendorf^R 5415C

Material

- Puntas 10µl
- Puntas 1000 µl
- Microtubos Eppendorf cónicos
- Vial de recuperación con tapa pre cortada

Reactivos

- Ditiotritol 200mM
- Iodoacteamida 1M
- Tripsina modificada grado secuenciación
- Estándar MassPrep MIX 1
- Formiato de amonio 200mM

5.6.6 Separación cromatográfica y detección

Todas las muestras fueron sometidas a una separación cromatográfica previo al análisis en el espectrómetro de masas mediante el equipo nanoUPLC modelo nano Accquity, Water, corp. Esto se realizó con un sistema de conexiones para la realización de separaciones en dos dimensiones con modalidad en línea,

bajo este esquema se realizó una estrategia de fraccionamiento en cinco fracciones y una de lavado, se realizó además un blanco de acetonitrilo al 100% entre cada muestra para evitar efectos de arrastre o contaminación del sistema (Tabla8).

Tabla 8 COMPOSICIÓN DE LAS FRACCIONES REALIZADAS EN CADA MUESTRA

Fracción	% de Acetonitrilo
1	11.1
2	14.5
3	17.4
4	20.8
5	45
6	65

De inicio se inyecta al equipo 1.0 µl de muestra (1.0 microgramos de proteína) en la columna de carga X-Bridge C-18, 5 micras, 300 micras x 5cms, en esta se aplicaron seis gradientes con diferente concentración de acetonitrilo como fase B y usando formiato de amonio a 200mM como fase A. para luego pasar a una columna de trampa, en este caso fue utilizada una columna Symmetry C-18, 5 micras, 150 micras x 2 cm y por último una columna analítica BEH, de 1.7 micras, 75 micras x 25 cm, esta acondicionada a 40°C y utilizando como fase B acetonitrilo con 0.1% de ácido fórmico (como se muestra en figura 2 y condiciones de tabla 9).

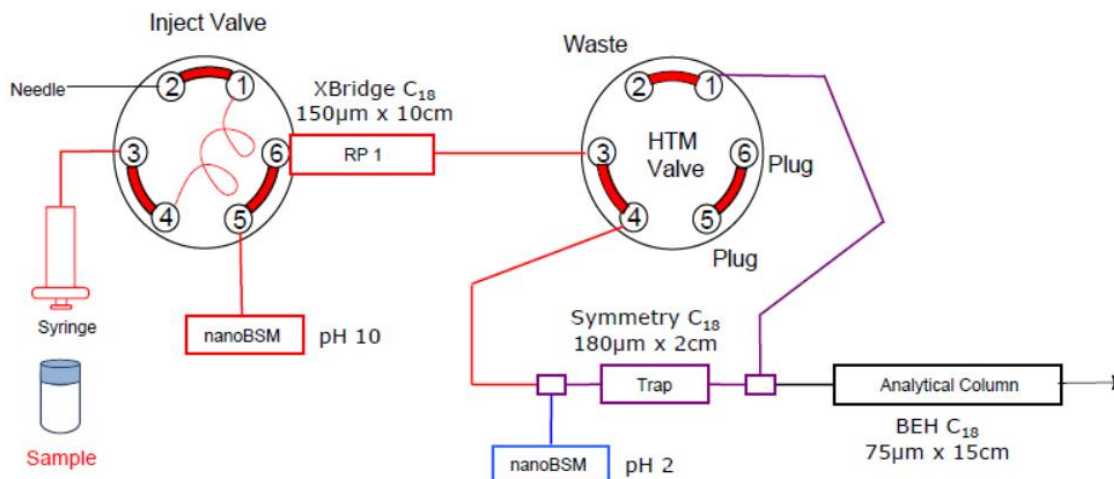


Figura 2 Diagrama de conexiones del sistema nano Acuity para las separaciones cromatográficas

Tabla 9 **COMPOSICIÓN DE LA SEPARACIÓN ANALÍTICA**

Tiempo (minutos)	Flujo(uL/min)	Agua/0.1% AF	Acetonitrilo	Curva de gradiente
Inicial	0.300	99.0	1.0	Inicial
5.00	0.300	90.0	10.0	6
45.00	0.300	50.0	50.0	6
50.00	0.300	50.0	50.0	6
65.00	0.300	40.0	60.0	6
75.00	0.300	95.0	5.0	6

El flujo de la columna fue dirigido hacia el espectrómetro de masas Q-TOF premier XE equipado con una interfase nano electrospray (Figura 3) operando bajo las siguientes condiciones:

- Voltaje de capilar (V) de 4000V
- Voltaje de cono de extracción 40.0V
- Voltaje de cono de muestra 5.0V
- Guía de iones 5.0V
- Temperatura de interfase 100°C
- Flujo de nitrógeno 1.7 L/hr
- Voltaje del detector MCP 1800V

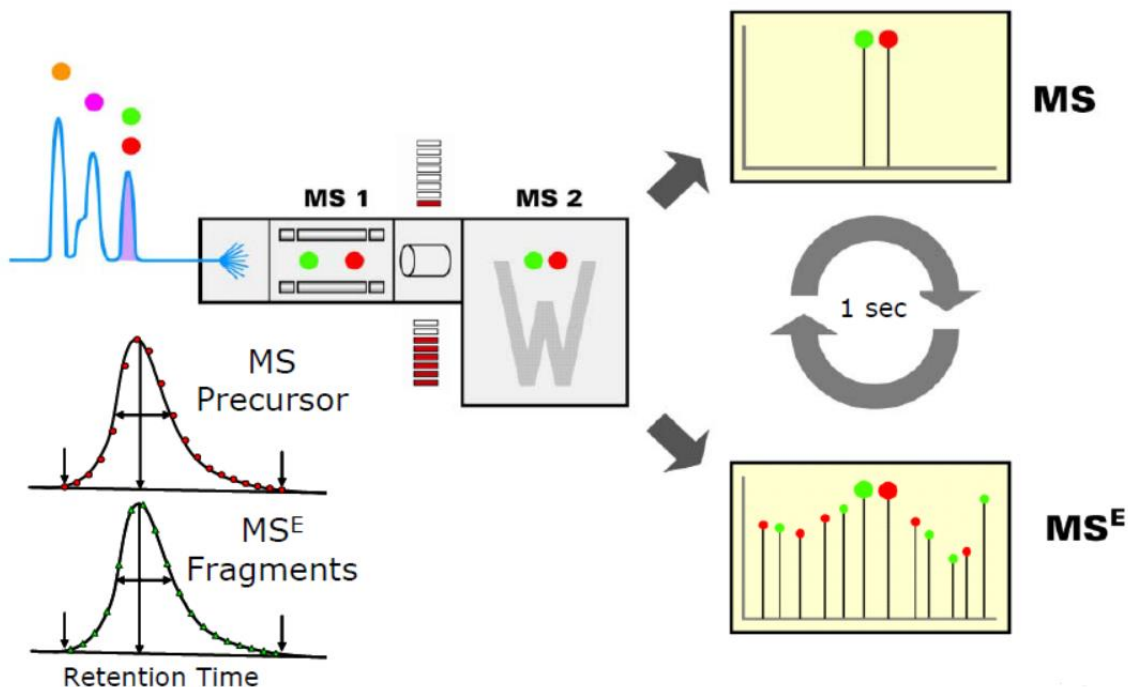


Figura 3 Diagrama del sistema de espectrometría de masas Q-TOF premier XE

5.6.7 Procesamiento de datos

El sistema fue controlado por medio del software MassLynx 4.1, Waters Corp., todas las fracciones obtenidas de cada muestra fueron exportadas en formato RAW para luego ser procesadas por el software ProteinLynx Global Server 3.0 usando el algoritmo MASCOT y la base de datos Uniprot-Swissprot en formato FASTA para el proteoma humano. Las proteínas reportadas fueron tomadas como positivamente identificadas cuando tenían un 95% de confiabilidad, más de 3 péptidos por proteína y cada péptido con más de 7 aminoácidos. Se realizó posteriormente un análisis de expresión de las proteínas encontradas comparando solamente el grupo de mujeres embarazadas con feto sano por ultrasonido y mujeres embarazadas con feto con SD, se filtraron después las proteínas en tres categorías según su expresión: sobreexpresadas, infraexpresadas y únicas en mujeres embarazadas con feto con SD por último se realizó un análisis comparativo de las proteínas encontradas con otros estudios similares.

5.7 Esquema de la estrategia general

6. RESULTADOS

6.1 Datos demográficos

En el periodo de Enero de 2014 a Diciembre de 2015 se recolectó una población de 10 embarazadas con feto sano por ultrasonido, 10 mujeres no embarazadas y 14 embarazadas con datos ultrasonográficos anormales, con sospecha de SD, confirmando en 9 casos SD. (Tabla 10).

Por medio de la historia clínica de cada una de las pacientes se obtuvo la información acerca de las probables causas que pudieran explicar las observaciones fetales por medio del ultrasonido descartando de esta manera los casos que no fueran compatibles con SD, así mismo se preguntó intencionadamente factores que pudieran aumentar el riesgo de presentar alguna cromosomopatía lo cual se descartó en todas las pacientes.

De las 14 pacientes con datos ultrasonográficos sospechosos para SD se eliminaron cinco mujeres por presentar un resultado de cariotipo normal (euploide); de éstos, los datos ultrasonográficos observados incluían principalmente la translucencia nuchal aumentada, intestino hiperecogénico, ausencia de hueso nasal con estenosis esofágica y probables cardiopatías. En estos casos se ofreció el asesoramiento genético específico para cada paciente.

Dentro del grupo de mujeres con feto con SD, una de ellas presentaba el antecedente de un hijo previo con SD, se analizó dicho caso en particular por la probable presencia de un rearrreglo cromosómico pero el resultado fue trisomía regular (Figura 7).

Tabla 10. **DATOS DEMOGRÁFICOS DE LA POBLACIÓN DE ESTUDIO**

	No embarazadas	Embarazadas con feto	Embarazadas con feto
--	----------------	----------------------	----------------------

	N=10	sano por USG N=10	con SD N=9
Lugar de origen	Nuevo León 10	Nuevo León 9 San Luis Potosí 1	Nuevo León 9
Hospital de procedencia	HU 10	HMI 6 HU 4	HU 5 Privada 4
Nivel socioeconómico	Mayor al mínimo 7 Ingreso mínimo 3	Mayor al mínimo 7 Ingreso mínimo 1 Ninguno 2	Mayora al mínimo 8 Ingreso mínimo 1
Estado civil	Solteras 7 Casadas 3	Unión libre 4 Casadas 3 Solteras 3	Casadas 8 Unión libre 1
Ocupación	Profesionistas 4 Empleadas 3 Estudiantes 3	Hogar 6 Estudiante 3 Empleada 1	Empleada 6 Hogar 3
Escolaridad	Licenciatura 6 Carrera técnica 2 Posgrado 2	Preparatoria 4 Secundaria 3 Primaria 1 Carrera técnica 1 Licenciatura 1	Licenciatura 3 Carrera técnica 3 Secundaria 2 Preparatoria 1
Religión	Católica 8 Cristiana 1 Ninguna 1	Católica 9 Ninguna 1	Católica 9

HU: Hospital Universitario UANL

HMI: Hospital Regional Materno Infantil, SSA, NL.

6.2 Resultados ultrasonográficos

Para los casos con SD, la translucencia/pliegue nucal aumentado fue una constante, a estos se agregaban otros datos principalmente la ausencia/hipoplasia del hueso nasal, lo cual coincide con la literatura, al ser los datos ultrasonográficos más frecuentemente encontrados en SD; otros hallazgos ultrasonográficos encontrados en los casos fueron aquellos sugerentes de cardiopatías y solo en un caso, hidronefrosis, la mitad de los casos se asoció al menos a un dato menor (Figura 5 y tabla 11).

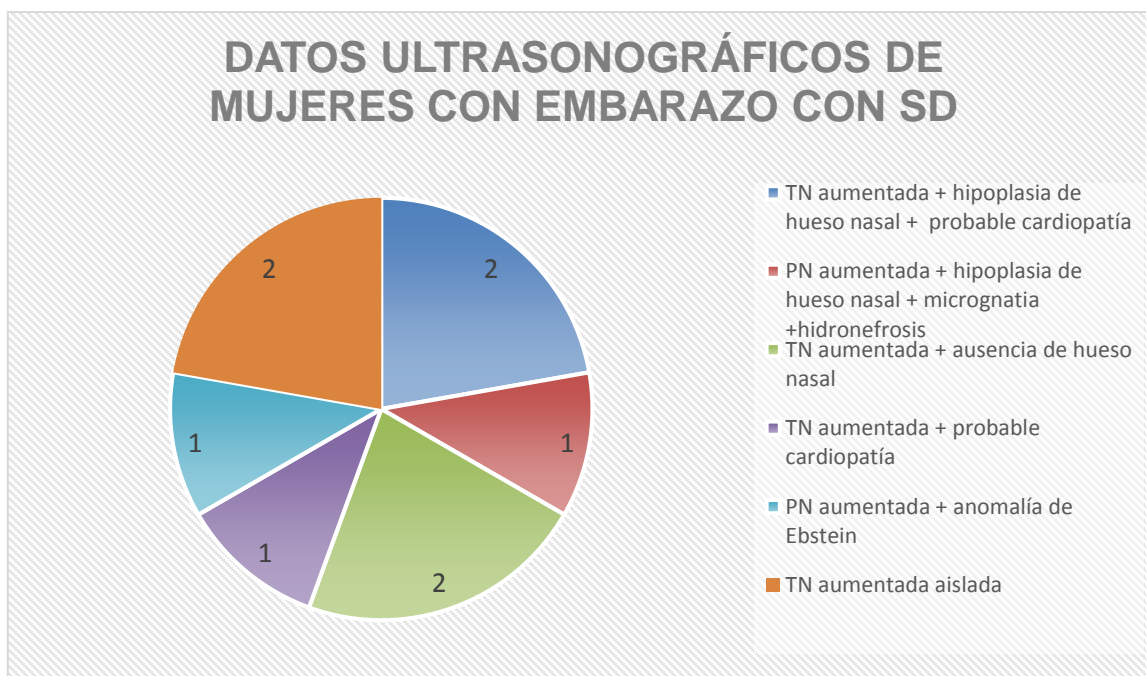


Figura 5. Datos ultrasonográficos de mujeres con embarazo con SD.

Tabla 11. **FRECUENCIA DE LOS DATOS ULTRASONOGRÁFICOS ENCONTRADOS EN MUJERES CON EMBARAZO CON FETO CON SD**

Dato ultrasonográfico	Frecuencia
Translucencia nuchal/pliegue nuchal	100% (9/9)
Hipoplasia/ausencia de hueso nasal	33% (3/9)
Malformación mayor	11% (1/9)
Marcador menor	55% (5/9)

La edad de las mujeres en los casos sospechosos y positivos para SD mostró una diferencia significativa, ya que en los casos con SD solamente una mujer no se encontraba en edad de riesgo siendo lo contrario para todos los casos sospechosos (Figura 6). La mediana de edad para las mujeres con embarazo con SD fue 39 años, mientras que para los casos sospechosos fue de 32 años.

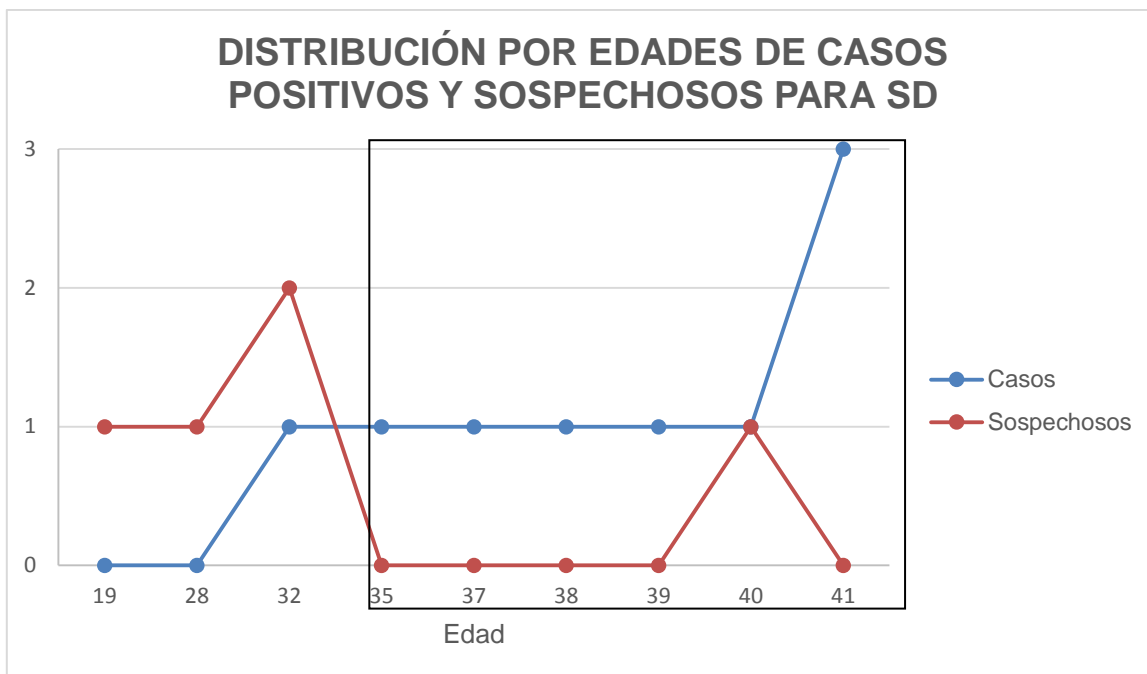


Figura 6 Distribución por edades de casos positivos y sospechosos para SD se observa el patrón esperado de que a mayor edad materna mayor la cantidad de casos reportados.

6.3 Resultados citogenéticos

Todas las muestras de sangre de las mujeres embarazadas fueron tomadas durante el segundo trimestre de gestación, con una mediana de 21.5 SDG. Para clasificar a las embarazadas dentro del grupo con SD (casos) se realizó cariotipo bandas GTG en líquido amniótico tomado por amniocentesis. El cariotipo fue procesado por el laboratorio de citogenética del departamento de Genética del Hospital Universitario “José Eleuterio González”.

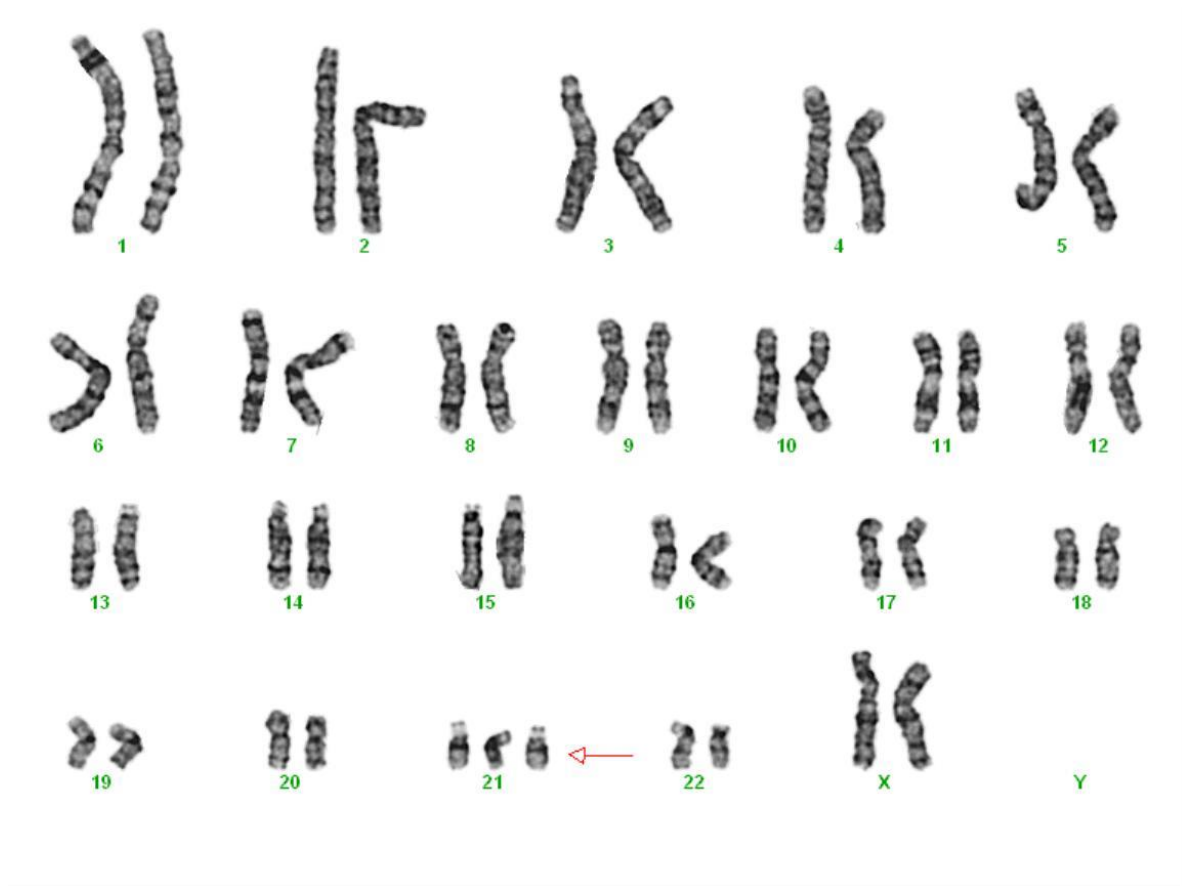


Figura 7 Cariotipo en líquido amniótico bandas GTG del caso 1 con trisomía 21 regular (SD) se resalta con una flecha el cromosoma extra.

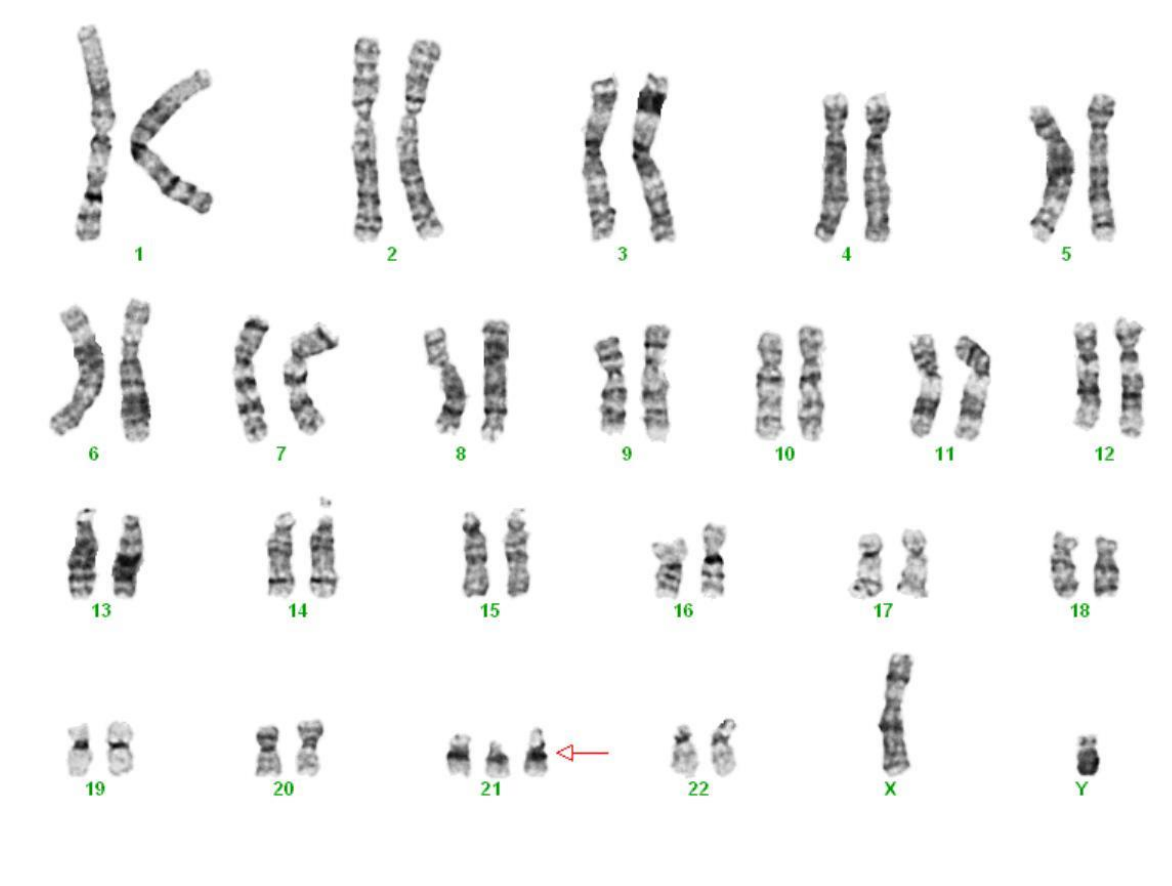


Figura 8 Cariotipo en líquido amniótico bandas GTG del caso 2 con trisomía 21 (SD) regular, se descarta de esta manera la presencia de un rearrreglo cromosómico que se sospechó inicialmente por el antecedente de un hijo previo con SD, de quién se desconocía su resultado citogenético.

6.3 Resultados proteómicos

Como parte de la preparación de las muestras de todas las pacientes se debe realizar una eliminación de las proteínas más abundantes en el suero que corresponden a albúmina y a IgG, ambas representan alrededor del 85% del total, esto para poder realizar un análisis adecuado y mediciones más precisas; para ello, se utilizó un kit de depleción de albúmina y proteína, luego las proteínas fueron cuantificadas mediante el espectrofotómetro NanoDrop^R ND-1000 donde se comprobó la pérdida de las proteínas mayoritarias (Tabla 11).

Tabla 11 **CONCENTRACIÓN PROTÉICA Y DEPLECIÓN DE ALBÚMINA/IgG**

Muestra	Concentración inicial		Concentración luego de depleción Albúmina/IgG	
	Proteína	Porcentaje	Proteína	Porcentaje de pérdida
Embarazadas con feto con SD	14.14 mg/dl	100%	1.67 mg/dl	88.1%
Embarazadas con feto por USG	13.45 mg/dl	100%	1.85 mg/dl	86.2%
No embarazadas	14.10 mg/dl	100%	0.958 mg/dl	93.2%

Posterior al tratamiento y análisis de la muestra se obtuvieron los cromatogramas para cada una de las pacientes, los cuales presentaban características similares dentro de cada grupo (intragrupo) pero diferencias entre cada uno de los tres grupos analizados (intergrupo) como se muestra en las figuras 9,10, 11 y 12. Gracias a la estandarización del método, estos resultados fueron completamente reproducibles y por medio del análisis posterior de todas las fracciones de los cromatogramas en el software ProteinLynx Global Server 3.0 se establecieron las diferencias específicas entre cada uno de los grupos de estudio.

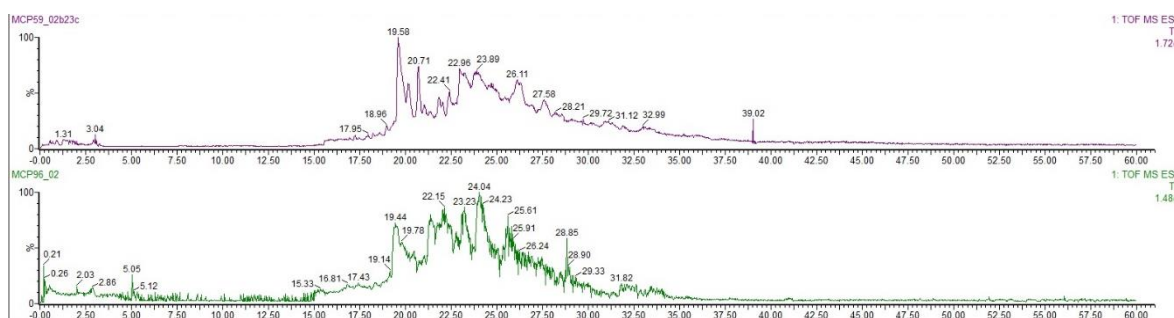


Figura 9 Comparación intragrupo de la fracción 2 de cromatogramas del grupo de mujeres embarazadas con fetos con SD (caso 2 y 3), se observa similitud entre ambos, el inferior presenta un ruido basal mayor al superior.

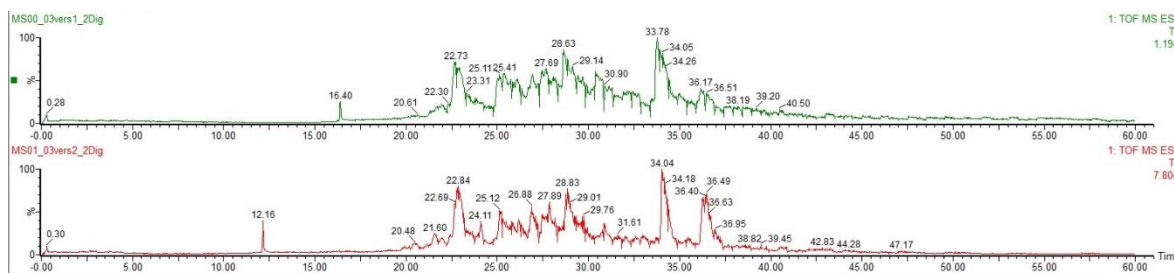


Figura 10 Comparación intragrupo de la fracción 3 de cromatogramas del grupo de mujeres embarazadas con feto sano por ultrasonido, se aprecia una similitud en la distribución de los picos, destaca la mayor intensidad del cromatograma superior

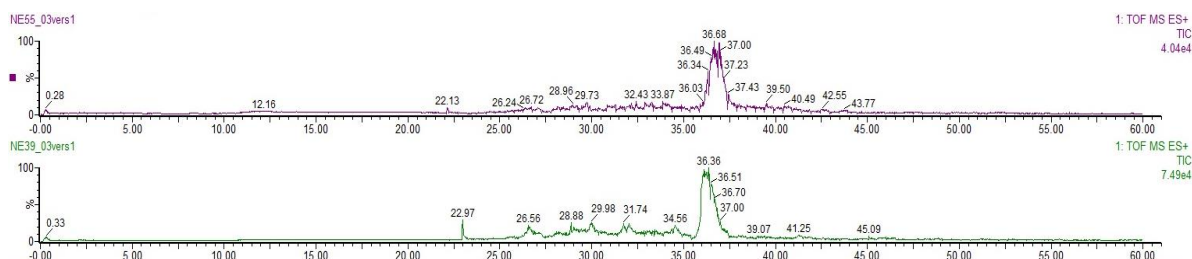


Figura 11 Comparación intragrupo de la fracción 3 de cromatogramas del grupo de mujeres no embarazadas, este grupo en particular es el que presenta mayor similitud.

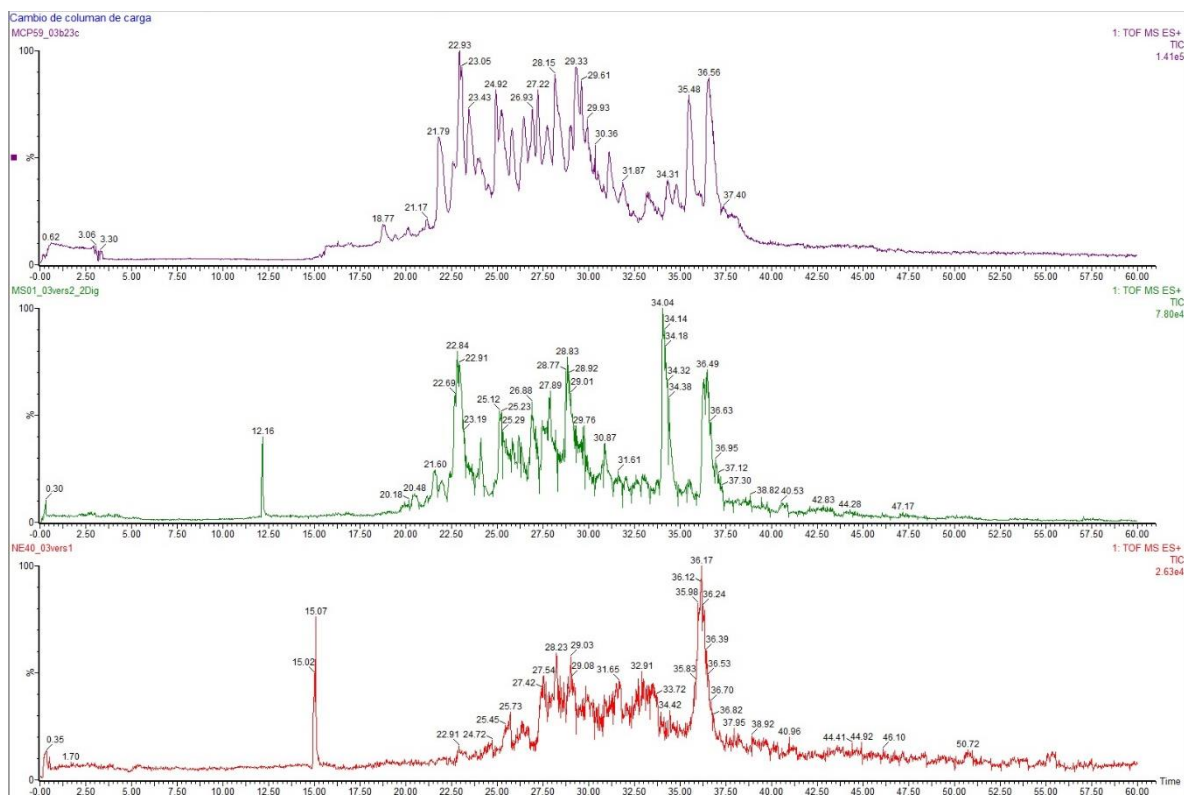


Figura 12 Comparación intergrupos de la fracción 3 del caso 2 (superior), con un control de mujer embarazada con feto sano por ultrasonido (medio) y control de mujer no embarazada (inferior) destaca ligera similitud entre los grupos de mujeres gestantes en comparación con el cromatograma de la mujer no embarazada.

Todas las fracciones fueron exportadas al software ProteinLynx Global Server 3.0 para su análisis. Se utilizó el grupo de mujeres no embarazadas solamente para validación.

De 3753 proteínas detectadas 290 mostraron ser consistentes en los dos grupos en comparación y en todas las réplicas biológicas de cada grupo (Figura 13, 14 y 15). Posteriormente se analizaron individualmente las proteínas clasificándolas en 3 grupos según su expresión para fines de este trabajo solo se utilizó aproximadamente la décima parte de ellas.

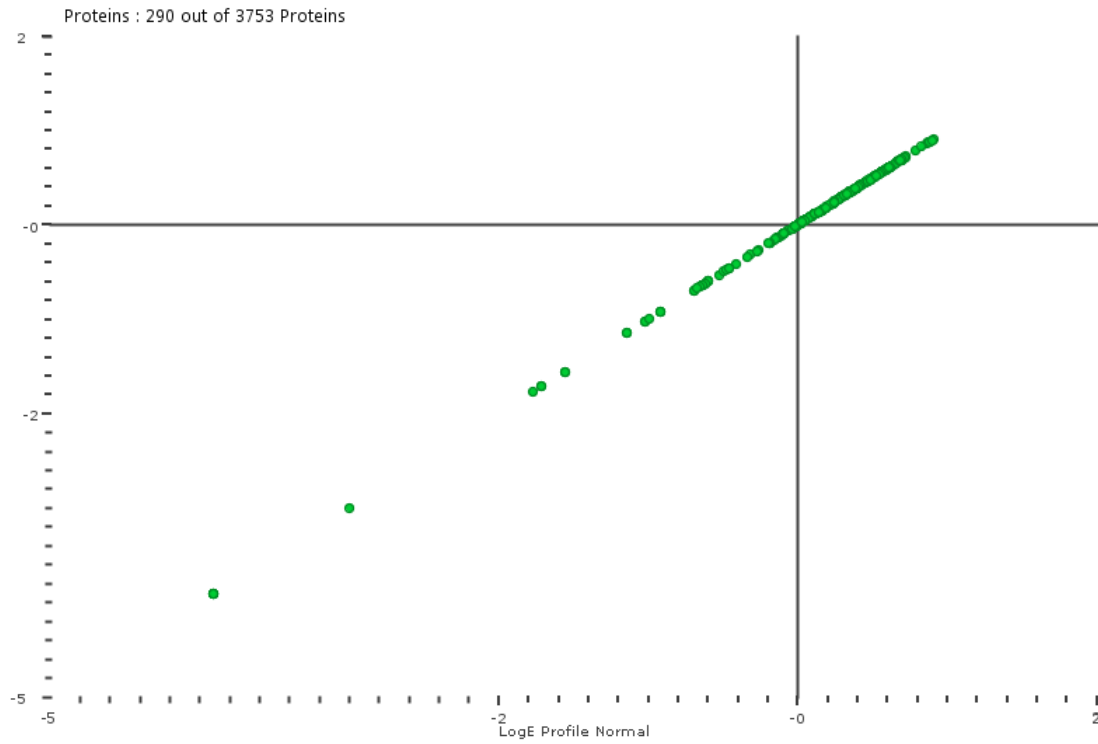


Figura 13. Perfil de expresión normalizado de 290 proteínas del grupo de mujeres con embarazos con feto sano por ultrasonido.

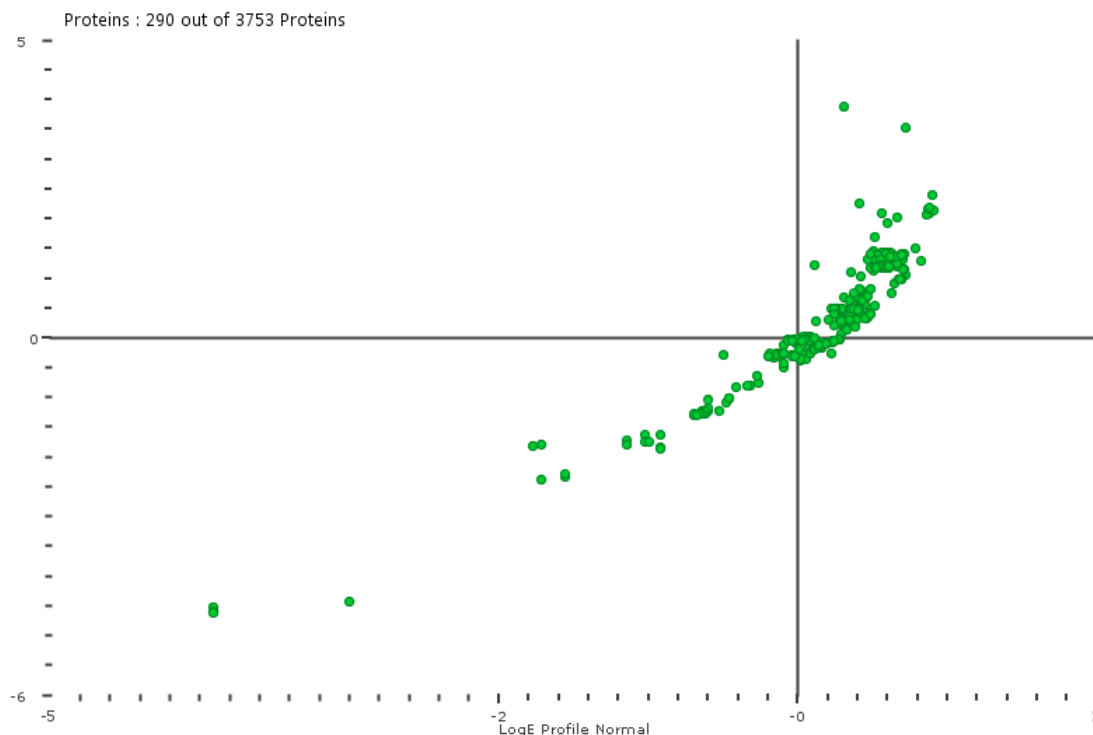


Figura 14. Perfil de expresión comparativa entre los dos grupos de mujeres embarazadas.

Las proteínas que se observan más alejadas en el perfil de expresión comparativo (figura 14) son aquellas cuya expresión destaca de las otras teniendo en el cuadrante inferior izquierdo las subexpresadas, mientras que en el cuadrante superior derecho se encuentran las de mayor expresión (tabla 12)

Tabla 12 **PROTEÍNAS CON EL NIVEL DE EXPRESIÓN MÁS SIGNIFICATIVO**

Proteína sobreexpresada	Nivel de expresión*
Complement protein C4B frameshift mutant	47.97 (3.87+/-1.52) [1.00]
IgG L chain	33.78.78 (3.52+/-0.97) [1.00]
cDNA FLJ55146, highly similar to Complement C4	11.02 (2.40+/-1.47) [1.00]
Proteína subexpresada	Nivel de expresión*
Anti-RhD monoclonal T125 kappa light chain	0.01 (-4.62+/-0.97) [0.0]
Ig kappa chain C region	0.01 (-4.61+/-0.73) [0.0]
Uncharacterized protein	0.01 (-4.60+/-0.87) [0.0]

*Las proteínas con [1.0] presentan una sobreexpresión definitiva mientras que [0.0] una subexpresión definitiva, el valor fuera del paréntesis representan la proporción, dentro del paréntesis se encuentra el logaritmo de la proporción seguido de la desviación estándar.

El primer grupo reportado (muestra de 20 proteínas) fue en el cual se encontraron las proteínas que presentaban una expresión superior en el grupo de mujeres embarazadas con feto con SD con respecto a las mujeres con feto sano (tabla 13), el segundo grupo contrario al anterior fue conformado por las 20 proteínas con la menor expresión en el grupo de mujeres con embarazo con feto con SD con respecto a mujeres con feto sano (tabla 14), el tercer grupo con proteínas únicas para el grupo de pacientes con feto con SD (15 proteínas) (tabla 15).

Tabla 13. PROTEÍNAS SOBREENEXPRESADAS EN MUJERES CON EMBARAZO CON FETO CON SD

No.	No. Entrada	Nombre	Proceso biológico	Función molecular
1	Q9UNU2	Complement protein C4B frameshift mutant	Activador del complemento, respuesta inflamatoria	Unión al complemento
2	S6C4Q9	IgG L chain	Respuesta inmunológica	Unión de antígenos
3	B4DDH0	cDNA FLJ55146, highly similar to Complement C4	Activador del complemento, respuesta inflamatoria	Componente del complemento de unión a C1q
4	A7L3A5	Angiotensinogen	Regulador de presión arterial, angiogénesis, envejecimiento, señalización celular	Factor de crecimiento, regulador de canal de sodio, activador de NADPH generador de superóxido
5	M0QXZ3	Complement C3	Activación del complemento, regulador positivo de angiogenesis y coagulación	Unión a receptores y cofactor, unión a lípidos y proteínas
6	B7Z1F8	cDNA FLJ53025, highly similar to Complement C4-B	Activador del complemento, respuesta inflamatoria	Unión al complemento
7	H0YFH1	Alpha-2-macroglobulin	Regulador negativo de la vía del complemento	Unión a proteínas
8	Q6N096	Putative uncharacterized protein DKFZp686I15196	Inmunidad	Simil inmunoglobulina
9	S6C4S4	IgG H chain	Respuesta inmunológica	Unión de antígenos
10	Q9Y509	VH3 protein	Formación de endodermo	Tirosin/serin/treonin cinasa

11	A4F255	Immunoglobulin G1 Fab heavy chain variable region	Respuesta inmunológica	Unión de antígenos
12	Q6P089	IGH@ protein	Inmunidad	Simil inmunoglobulina
13	Q6MZV6	Putative uncharacterized protein DKFZp686L19235	Inmunidad	Simil inmunoglobulina
14	Q6MZX9	Putative uncharacterized protein DKFZp686M08189	Inmunidad	Simil inmunoglobulina
15	A0A0G2JMB2	Ig alpha-2 chain C region	Respuesta inmunológica	Unión de antígenos
16	A0A0M3KKW6	Fab Hu 15C1 Heavy chain	Respuesta inmunológica	Unión de antígenos
17	Q9NPP6	Immunoglobulin heavy chain variant	Respuesta inmunológica	Unión de antígenos
18	Q6ZP87	CDNA FLJ26266 fis, clone DMC05613	Inmunidad	Simil inmunoglobulina
19	V9GYE3	Apolipoprotein A-II	Respuesta inflamatoria aguda, homeostasis de colesterol	Unión a receptor de apolipoproteína, unión a colesterol y transporte
20	B2R7F8	Plasminogen	Coagulación, desensamblaje de matriz extracelular, regulación de fibrinolisis	Unión a apolipoproteína, unión proteica a dominios específicos

Tabla 14. **PROTEÍNAS SUBEXPRESADAS EN MUJERES CON EMBARAZO CON FETO CON SD**

No.	No. Entrada	Nombre	Proceso biológico	Función molecular
1	Q5EFE6	Anti-RhD monoclonal T125 kappa light chain	Activador del complemento, respuesta inflamatoria	Unión al complemento
2	P01834	Ig kappa chain C region	Respuesta inmunológica	Unión de antígenos
3	Q6GMX0	Uncharacterized protein	Inmunidad	Simil inmunoglobulina
4	Q6PIL8	IGK@ protein	Inmunidad	Simil inmunoglobulina
5	H3BS21	Haptoglobin	Procesos inmunes, regulador negativo de procesos catabólicos de peróxido de oxígeno	Antioxidante, unión a hemoglobina, unión a proteína
6	G3GAU4	Anti-H1N1 influenza HA kappa chain variable region	Respuesta inmunológica	Unión de antígenos
7	P01620	Ig kappa chain V-III region SIE	Respuesta inmunológica	Unión de antígenos
8	PO1623	Ig kappa chain V-III region WOL	Respuesta inmunológica	Unión de antígenos
9	A2NB46	Cold agglutinin FS-2 L-	Respuesta inmunológica	Unión de antígenos

		chain		
10	P04206	Ig kappa chain V-III region GOL	Respuesta inmunológica	Unión de antígenos
11	Q9UL78	Myosin-reactive immunoglobulin light chain variable region	Respuesta inmunológica	Unión de antígenos
12	Q6MZV6	PO1622 Ig kappa chain V-III region Ti	Respuesta inmunológica	Unión de antígenos
13	H7C5E8	Serotransferrin	Organización de filamentos de actina, respuesta celular a ion hierro	Unión y transporte de hierro iónico
14	P00738	Haptoglobin	Procesos inmunes, regulador negativo de procesos catabólicos de peróxido de oxígeno	Antioxidante, unión a hemoglobina, unión a proteína
15	Q6N092	Putative uncharacterized protein DKFZp686K18196	Inmunidad	Simil inmunoglobulina
16	Q8WY24	SNC66 protein	Inmunidad	Simil inmunoglobulina
17	P01876	Ig alpha-1 chain C region	Respuesta inmunológica	Unión de antígenos
18	B4DHZ6	Transferrin, isoform CRA-c	Organización de filamentos de actina, respuesta celular a ion hierro	Unión y transporte de hierro iónico
19	A0A0A0MRD9	Haptoglobin-related protein	Procesos inmunes, regulador negativo de procesos catabólicos de peróxido de oxígeno	Antioxidante, unión a hemoglobina, unión a proteína
20	A0A087WYJ9	Ig mu chain C region	Respuesta inmunológica	Unión de antígenos

Tabla 15. PROTEÍNAS EXPRESADAS ÚNICAMENTE EN MUJERES CON EMBARAZO CON FETO CON SD

No.	No. Entrada	Locus	Nombre	Proceso biológico	Función molecular
1	P04003	1q32	C4b-binding protein alpha chain	Controla la activación de la vía clásica del complemento	Unión a RNA Poli A y a proteínas
2	F8WAS2	3p21.1	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H1	Transportador de hialuronato y regulador de actividad endopeptidasa	Unión a ion calcio y actividad inhibitoria de endopeptidasa
3	B7Z8Q4	11p15.4	Hemopexin	Homeostasis del hierro, transporte y proceso metabólico de grupo Hemo	Actividad transportadora de Hemo
4	D9ZB55	19q13.32	Apolipoprotein E	Media la unión, internalización y catabolismo de las partículas lipoprotéicas	Actividad antioxidante, unión y transporte de colesterol y lípidos, receptor de VLDL

5	B4E1C2	3q27.3	Kininogen 1, isoform CRA_b	Regulador negativo de la coagulación y proteólisis, regulador positivo de apoptosis	Unión a heparina, proteínas y zinc
6	D9IWP9	17q24.2	Beta-2-glycoprotein I	Involucrado en la vía intrínseca de la coagulación, regulador negativo de angiogénesis y fibrinólisis	Unión a heparina, glucoproteína y activador de lipoprotein lipasa
7	V9HWF6	9q32	Alpha-1-acid glycoprotein	Regulador de procesos inmunes, regulador negativo de producción de factor de necrosis tumoral e interleucina 6	Unión a proteínas
8	Q1RMF8	11q23.3	Transmembrane protease serine 13	Proteólisis y endocitosis mediada por receptor	Actividad endopeptidasa de tipo serina y actividad de receptor de captura
9	Q53G59	1q32.1	Kelch-like protein 12	Mediador de transporte entre Golgi y RE, monoubiquitinización protéica, involucro en vía Wnt	Unión a proteínas
10	Q5TFM2	1q31.13	Complement factor H	Activador del complemento vía alterna	Unión a heparina y a heparán proteoglicanos
11	G3V595	14q32.13	Alpha-1-antichymotrypsin	Respuesta inflamatoria aguda y mantenimiento del epitelio gastrointestinal	Unión a DNA, proteínas y actividad endopeptidasa de tipo serina
12	H0YAS8	8p21.1	Clusterin	Morfogenesis celular, mantenimiento de mielina en SNC, activación de microglia, regulación negativa de beta amiloide, regulador negativo de respuesta a daño a DNA	ATPasa, unión a chaperona, unión a proteínas mal plegadas, unión a protein ubiquitin ligasa
13	P02656	11q23.3	Apolipoprotein C-III	Homeostasis de colesterol, regulador negativo de biosíntesis de ácidos grasos y de metabolismo de lípidos	Unión a colesterol, inhibidor de actividad lipasa, unión a fosfolípidos
14	P08582	3q29	Melanotransferrin	Homeostasis del ion hierro, regulador positivo de actividad de plasminogeno y desensablaje de matriz extracelular	Unión a ion hierro y proteínas
15	D6RBJ7	4q13.3	Vitamin D-binding protein	Respuesta a estradiol, transporte de vitamina D y lactancia	Unión a actina y vitamina D

Por último de las proteínas expresadas únicamente en mujeres embarazadas con feto con SD se analizó la ruta biológica a la que correspondían encontrando que la mayoría se involucran en la coagulación y la vía del complemento, seguido de respuesta inmune, se desglosan en la tabla 16.

Tabla 16. DISTRIBUCIÓN DE LAS PROTEÍNAS ENCONTRADAS EXCLUSIVAMENTE EN EMBARAZOS CON FETO CON SD SEGÚN SU VÍA BIOLÓGICA

Ruta biológica	Total de Proteínas	Porcentaje
Complemento y/o coagulación	15	33.33
Respuesta inflamatoria e inmune	15	20.00
Metabolismo	15	20.00
Unión, transporte de moléculas	15	20.00
Vía de señalización	15	6.66

CAPITULO VII

7. DISCUSIÓN

A la fecha las estrategias para el diagnóstico prenatal se han dirigido al cálculo de riesgo para las pacientes embarazadas con respecto al basal basados en la edad y apoyados en recursos bioquímicos y de imagen, este campo a avanzado en los últimos años a pasos agigantados con la incorporación del DNAIf que es capaz incluso de detectar microdeleciones, lo que lleva a pensar en un futuro prometedor sin embargo actualmente al menos en nuestro medio estas técnicas de detección no están disponibles para todo el público lo que constituye un problema de salud pública importante, esto se comprueba en la muestra de este estudio donde solamente una paciente de todas las captadas presentó una prueba de DNAIf y ninguna presentó marcadores bioquímicos; confiar solamente en la edad materna y marcadores ecográficos representa la pérdida del 40% de los casos positivos, esto sumado a la falta de capacitación y sensibilización del médico de primer contacto nubla el panorama, por eso se propone la inclusión de búsqueda de biomarcadores proteómicos que logren orientar ayudar a la detección de SD por medio de obtención de proteínas del suero materno y observar su presencia y expresión en condiciones patológicas para distinguirlas de aquellas en gestación fisiológica. El tratar de caracterizar un proteoma en este tipo de condiciones lleva consigo una significativa carga de trabajo debido principalmente al análisis de datos que pueden ser obtenidos en los cuales se puede perder o malinterpretar algún dato valioso y debido a que es un campo relativamente nuevo no existe una guía que ilustre como lograrlo ya que el dato insignificante de hoy puede ser el biomarcador determinante de mañana, por lo que es importante compartir y comparar los datos obtenidos entre todos los involucrados en esta clase de estudios relacionados para poder entre todos lograr una caracterización más detallada y en un futuro realmente poder llamarlo proteoma específico, por lo pronto podemos aspirar a la obtención de proteínas relacionadas que puedan servir como biomarcadores en la identificación de este tipo de padecimientos.

Se incluyeron los tres grupos de mujeres para poder establecer las diferencias entre el proteoma de embarazo en condiciones fisiológicas y en condición patológica de un embarazo con feto con SD tomando como estándar interno de referencia al grupo de mujeres no embarazadas.

De los grupos analizados por medio de los datos obtenidos en la historia clínica se obtuvo una mediana para la edad en el grupo de mujeres no embarazadas de 28 años esto ya que la mayoría fueron recolectadas de pacientes nulíparas estudiantes o recién egresadas de estudios universitarios, el grupo de mujeres embarazadas con feto sano por ultrasonido presentó una mediana para la edad de 25 años, esto concuerda con la relación de riesgo asociado a la edad materna para SD, por último la mediana para el grupo de casos de mujeres con embarazo con feto con SD fue de 38 años igualmente concordante con lo reportado acerca del incremento de riesgo con edad materna mayor a 35 años.

Existen en el grupo de mujeres embarazadas con feto con SD tres casos particulares, el primero de ellos corresponde a una mujer con antecedente de 4 gestas de las cuales la primera ocurre a los 18 años y presentó SD, la segunda termina en aborto espontáneo, la tercera termina en parto de un producto femenino sano y la última a los 38 años de edad con sospecha ultrasonográfica de SD, razón por lo que se incluyó en el protocolo de estudio, en este caso se tomó en cuenta la edad de riesgo de la paciente así como los hallazgos ultrasonográficos del producto, sin embargo llama la atención el antecedente de la pérdida gestacional previa y el primer producto con SD a una edad no considerada de riesgo lo que alza la sospecha de la existencia de algún rearrreglo cromosómico que involucrara al cromosoma 21, se ingresó al protocolo y se solicitó a la madre el resultado citogenético del hijo afectado, al cabo de 15 días regresa para su cita de asesoramiento donde muestra un resultado de cariotipo del hijo anterior con fórmula cromosómica 47,XY+21 que corresponde a un individuo con trisomía 21 regular, de la misma manera se entrega el resultado de cariotipo en líquido amniótico de la gesta actual (Figura 8) con el mismo

complemento cromosómico, por lo que se descarta la posibilidad de un rearrreglo hereditario, se otorga asesoramiento y se menciona como factor de riesgo importante en este embarazo la edad materna avanzada. El segundo caso destacado corresponde a una paciente cuyo motivo de envío fue un tamiz con DNAfl positivo para SD y solicitud de estudio confirmatorio, este caso destaca ya que la paciente posterior a la explicación del estudio, los procedimientos, los riesgos y beneficios se niega a realizarse cariotipo en líquido amniótico sin embargo acepta entrar al protocolo de estudio otorgando su muestra sanguínea, se da indicación a la madre de la necesidad de valorar al producto al nacimiento y la importancia del estudio citogenético en este posnatal; este caso es importante ya que permite abordar de forma global la relación médico paciente donde es igual de válida la opinión de ambas partes, como el informar a las pacientes es la mejor herramienta para la toma de decisiones y el empleo de las buenas prácticas clínicas en investigación. El último caso a destacar es de una paciente embarazada la cual es enviada del departamento de perinatología por presentar aumento de pliegue nuchal y anomalía de Ebstein; como se vio anteriormente la translucencia nuchal / pliegue nuchal fue la causa más común de envío a valoración presente en la totalidad de los casos (tabla 11) este fue el único caso con una malformación mayor y aunque es sabido que las cardiopatías congénitas son bastante frecuentes en SD (Figura 1), la anomalía de Ebstein en particular es extremadamente rara, ya que solo se ha asociado a 9 casos a la fecha (27).

Respecto a los datos ultrasonográficos si bien como se observó en la figura 4 y la tabla 11 corresponde con los datos más comúnmente reportado en SD, los cinco casos sospechosos también presentaban tres de ellos hipoplasia de hueso nasal y todos pliegue nuchal aumentado por lo que podemos decir que el índice de detección para nuestra muestra solamente tomando en cuenta la translucencia nuchal / pliegue nuchal es de 64% lo que menciona la literatura donde reportan un índice de detección solo con estos marcadores de 60% (tabla 7).

De todas las pacientes incluidas en el grupo de embarazadas con feto con SD a ocho de ellas se les realizó cariotipo en líquido amniótico y solo un caso anteriormente mencionado se realizó cariotipo en sangre periférica de manera posnatal, todos los resultados obtenidos correspondieron a trisomía regular según lo esperado basados en la literatura (tabla 2). La trisomía regular es el resultado de una no disyunción y en SD generalmente ocurre durante meiosis I materna (tabla 3) cuando un óvulo que presenta una división desigual durante la meiosis I dejando una de sus células con dos copias del cromosoma 21 mientras que la otra con ninguna copia, posteriormente este óvulo con dos copias es fertilizado por un espermatozoide normal con una copia del cromosoma 21 provocando la trisomía. Del total de los resultados seis de ellos fueron 47,XY+21 correspondiente a individuos masculinos con SD y tres fueron 47,XX+21 correspondiente a individuos femeninos con SD.

Con respecto a los resultados proteómicos, en SD no es algo nuevo diversos biomarcadores han sido reportados desde principios de la década, sin embargo la mayoría de los estudios a la actualidad se basan solamente en la búsqueda de biomarcadores de manera cualitativa como el caso Koster en 2009 (26), Kolialexi en 2011 (25), Sillence en 2013 (28) y más reciente Yao en 2016 (29), pero pocos estudios como el de Kolla en 2010 han agregado la cuantificación como un método de indentificación de estas proteínas, el estudio previo en el que se basa este trabajo Medina Aguado 2013 tampoco incorpora la cuantificación por lo que esto representa una ventaja sobre lo reportado actualmente.

Posterior a su identificación y cuantificación las 3753 proteínas encontradas fueron comparadas con resultados encontrados en otros estudios similares para determinar similitudes o diferencias entre los datos encontrado esto se realizó basados en 4 estudios principales: Kolla et al 2009(30), Medina Aguado 2013, Sillence et al 2013(28) y Yuan Yao et al 2016(29), los resultados se muestran en la tabla 17.

Tabla 17. COMPARACIÓN DE PROTEÍNAS ENCONTRADAS EN EMBARAZOS CON FETO CON SD EN DIFERENTES ESTUDIOS

No. Entrada	Nombre	Kolla et al 2010	Medina Aguado et al 2013	Sillence et al 2013	Yuan Yao et al 2016	Burciaga et al 2016
B2R7F8	Plasminogen		Presente			Sobreexpresada en SD
A0A0G2JL54	Complement C4-B	Sobreexpresada en SD	Presente			Sobreexpresada en SD
P01023	Alpha-2-macroglobulin	Infraexpresada en SD		Presente		Sobreexpresada en SD
F8W696	Apolipoprotein A-I			Presente		Sobreexpresada en SD
P02649	Apolipoprotein E			Presente	Presente	Presente
P09871	Complement C1s subcomponent			Presente		Ausente
P01031	Complement C5	Sobreexpresada en SD		Presente		Ausente
P07358	Complement C8B	Sobreexpresada en SD		Presente		Ausente
P02751	Fibronectin	Sobreexpresada en SD		Presente		Presente (Nivel de confianza menor a 95%)
A0A0D9SG88	Complement factor H	Presente			Presente	Presente
P04217	alpha-1B-glycoprotein				Presente	Sobreexpresada en SD (Nivel de confianza menor a 95%)
P02749	Beta-2-glycoprotein 1	Infraexpresado en SD			Presente	Presente
Q03591	Complement factor H-related protein 1				Presente	Ausente
B4E1C2	Kininogen 1, isoform CRA_b				Presente	Presente
P20742	Pregnancy zone protein	Sobreexpresada en SD				Sobreexpresada en SD
P04003	C4b-binding protein alpha chain protein	Sobreexpresada en SD				Presente
P02790	Hemopexin	Sobreexpresada en SD				Sobreexpresada
P02787	Serotransferrin	Infraexpresada en SD				Sobreexpresada en SD
P02743	Serum amyloid P-component	Sobreexpresada en SD				Ausente

Como se observó en la tabla 12 las proteínas que mayormente se expresaron tuvieron que ver con la vía del complemento y coagulación y las que menor expresión presentaron principalmente con inmunidad mediada por inmunoglobulinas. De los perfiles de expresión de las embarazadas se utilizaron

las 20 proteínas que presentaron mayor expresión en embarazos con SD, 20 proteínas que la menor expresión y 15 proteínas únicas cuyas rutas biológicas se discuten comparan en la siguiente tabla (tabla 18).

Tabla 18. COMPARATIVA ENTRE LAS RUTAS BIOLÓGICAS DE LAS PROTEÍNAS ENCONTRADAS EN FUNCIÓN AL GRUPO DE EMBARZADAS CON FETO CON SD

Ruta biológica	Proteínas sobreexpresadas	Proteínas subexpresadas	Proteínas únicas
Complemento y/o coagulación	25% (5/20)	5% (1/20)	33% (5/15)
Respuesta inflamatoria e inmune	55% (11/20)	70% (14/20)	20% (3/15)
Metabolismo	10% (2/20)	0% (0/20)	13% (3/15)
Unión, transporte de moléculas	0% (0/20)	10% (2/20)	13% (3/15)
Vía de señalización	5% (1/20)	0% (0/20)	6% (1/15)
Antioxidante	0% (0/20)	15% (3/20)	0% (0/15)
Formación de endodermo	5% (1/20)	0% (0/20)	0% (0/15)

Las rutas que sobresalen corresponden a la vía del complemento y/o coagulación y las de respuesta inmune siendo las proteínas de la primera ruta las más frecuentemente encontradas en los grupos de sobreexpresión y en el grupo de proteínas únicas concordante con otros estudios como Kolla et al 2010, donde se encontraron múltiples proteínas asociadas al complemento como la proteína C4B del complemento presente de igual manera en este estudio sin embargo otras

como C5 y C8B las cuales se encuentran elevadas en el estudio de Kolla et al 2010 y presentes en el estudio de Sillence et al 2013 no se encontraron presentes en nuestra muestra (tabla 16), esto puede deberse a diferencias étnicas, de edad o algún otro factor que no se ha tomado en cuenta sin embargo coinciden en la ruta biológica; en estudios en ratones se ha experimentado con la vía alterna del complemento obteniendo como resultado abortos espontáneos (31,32), esto podría explicar porque el 80% de los casos de SD terminan en pérdida gestacional, sería interesante en estudios posteriores estudiar productos de aborto en búsqueda intencionada de proteínas relacionadas a esta vía. De la vía de respuesta inmune se encontraron de manera abundante en los tres grupos esto en otros estudios lo refieren como mayoritariamente de origen materno(30), sin embargo el hecho que se encuentren subexpresadas en un mayor porcentaje puede orientar algún defecto en la inmunidad.

De estos grupos se encontraron proteínas específicas que debido a su función es importante mencionar, tal es el caso del plasminogeno el cual fue encontrado en el trabajo en el cual se basa este estudio, en esta ocasión no se encontró como una proteína única de SD pero si se observó un aumento en su expresión en los casos con feto con SD, esta proteína disuelve la fibrina de los coágulos sanguíneos y actúa como factor proteolítico en una variedad de procesos incluido el desarrollo embrionario, remodelación de tejido, invasión de tumor e inflamación. se encuentra involucrada en múltiples vías biológicas dentro de las que tiene mayor relevancia es en la vía de disolución de coágulos de fibrina y la formación de placas de Beta amiloide y metabolismo de la proteína precursora de amiloide activo con respecto a la primera vía es importante porque como ya vimos muchas de las proteínas encontradas son relacionadas a procesos de coagulación o complemento, mientras que la segunda vía está relacionada directamente con la enfermedad de Alzheimer por la producción de placas de beta amiloide, en los casos de SD se ha visto un incremento en la frecuencia de esta pudiera existir una correlación con respecto a estos hallazgos.

La vía de disolución de coágulos de fibrina está compuesta por 11 genes: *PLG* 6q26, *SERPINE2* 2q36.1, *SERPINF2* 17p13.3, *SERPINB8* 18q22.1, *SERPINE1* 7q22.1, *SERPINB6* 6p25.2, *PLAT* 8p11.21, *PLAU* 10q22.2, *PLAUR* 19q13.31 y *HRG* 3q27.3 (figura 16)

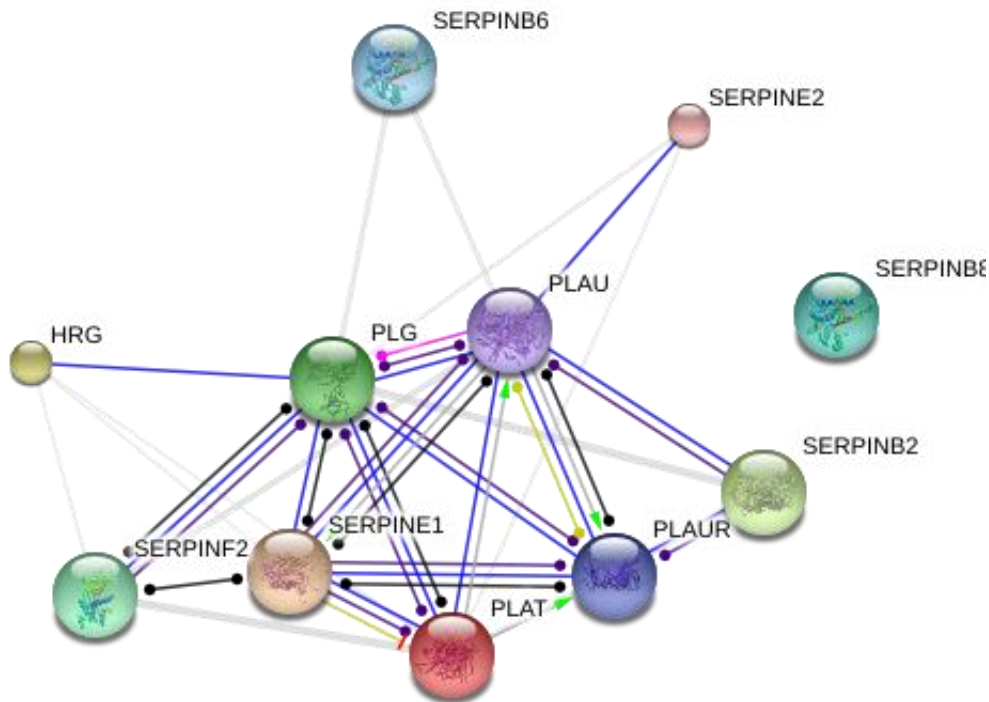


Figura 15. Interactoma del plasminógeno en la vía de disolución de coágulos de fibrina PLG representa al plasminógeno se observa existe una regulación entre las proteínas de la familia de las Serpinas y las proteínas activadoras de plasminógeno. Tomada de PathCards Pathway Unification Database

La vía de la formación placas de Beta amiloide y metabolismo de la proteína precursora de amiloide activo está compuesta por 23 genes: *MMP2*, 16q21, *MMEL1* 1p36.32, *ADAM9* 8p11.22, *ADAM17* 2p25, *MMP9* 20q13, *MME* 3q25.2, *IDE* 10q23.33, *APPL1* 3q14.3, *APH1A* 1q21.2, *APP* 21q21.3, *ADAM10* 15q21.3, *PSEN1* 14q24.2, *CST3* 20p11.21, *NCSTN* 1q23.2, *BACE1* 11q23.3, *CTSB* 8p23.1, *PLG* 6q26, *PLAT* 8q11.21, *PSENEN* 19q13.12 (figura 17)

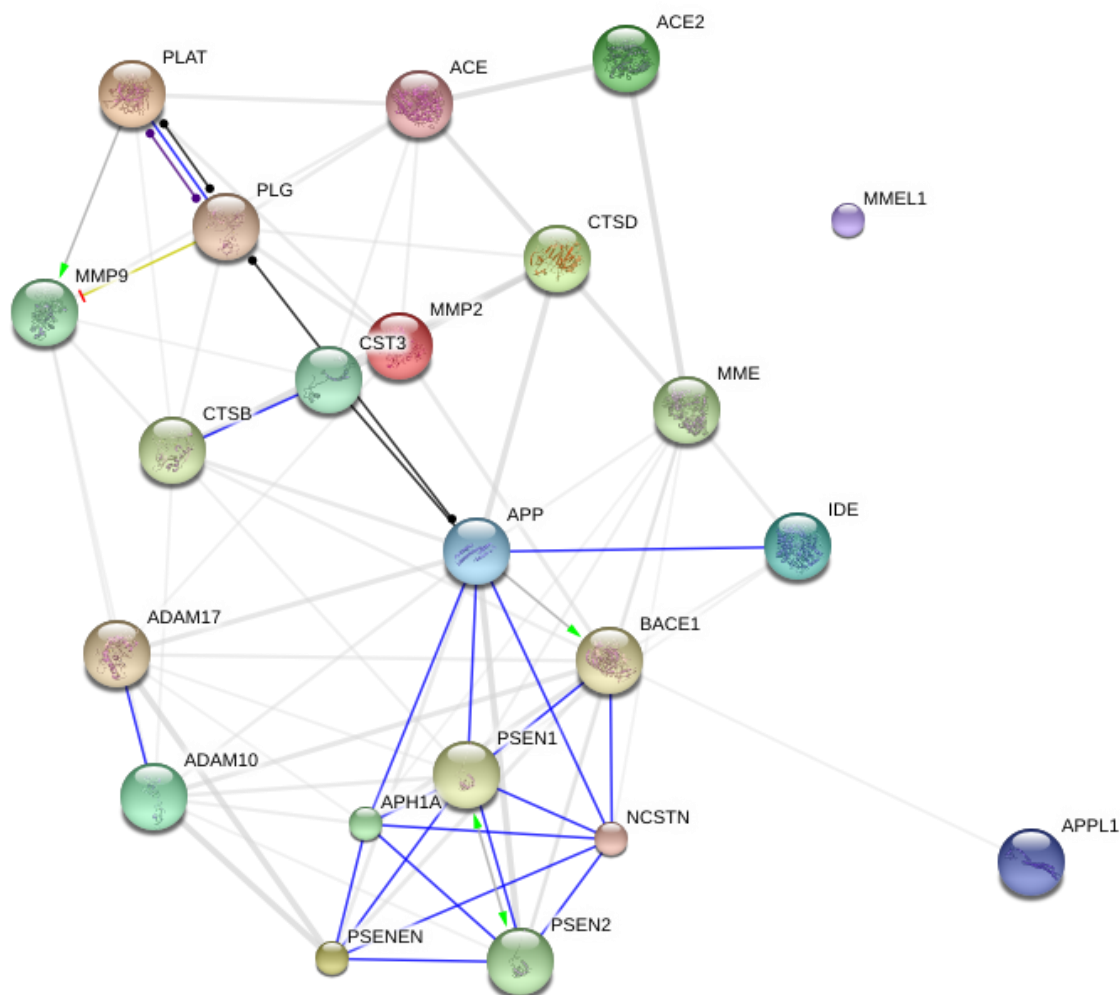


Figura 16. Interactoma del plasminógeno en la vía de formación placas de Beta amiloide y metabolismo de la proteína precursora de amiloide activo PLG representa al plasminógeno a diferencia de la vía de disolución aquí solo se ve la interacción que tiene con la proteína activadora de plasminógeno PLAT y la inhibición a la metaloproteasa 9, el verdadero vínculo sería a través de la cistatina 3 CST3 que es un regulador de proceso enzimáticos. Tomada de PathCards Pathway Unification Database

Otra de las proteínas sobreexpresadas de importancia es VH3 ya que uno de sus procesos biológicos es la formación de endodermo y participación en la vía de señalización de MAPK con mayor relación a ERK1 por lo que está sujeta a la regulación de proliferación, crecimiento y muerte celular.

Dentro del grupo de las proteínas subexpresadas la Haptoglobina llama la atención por su función biológica antioxidante al ser regulador de los procesos catabólicos del peróxido de oxígeno, se ha observado en los pacientes con SD un proceso de envejecimiento temprano, probablemente esta pudiera ser una de las proteínas involucradas en este proceso.

En el grupo de proteínas únicas en fetos con SD dejando de lado las que intervienen en complemento y coagulación destaca la Apolipoproteína E no solo verse presente en otros estudios como Sillence et al 2013 y Yuan Yao et al 2016 sino porque ApoE es una apolipoproteína mayor en el quilomicrón, se une a un receptor celular periférico hepático específico y es esencial en el catabolismo de las lipoproteínas ricas en triglicéridos y está implicado en la enfermedad de Alzheimer en especial cuando se presenta con la variante $\epsilon 4$ en una o dos copias, esta enfermedad como se mencionó anteriormente presenta un riesgo incrementado en estos pacientes, esta vía está conformada por 51 genes de los cuales los más importantes son *APOE* 19q13.32, *APP* 21q21.3, *PSEN1* 14q24.2 y *PSEN2* 1q42.13 (Figura 18).

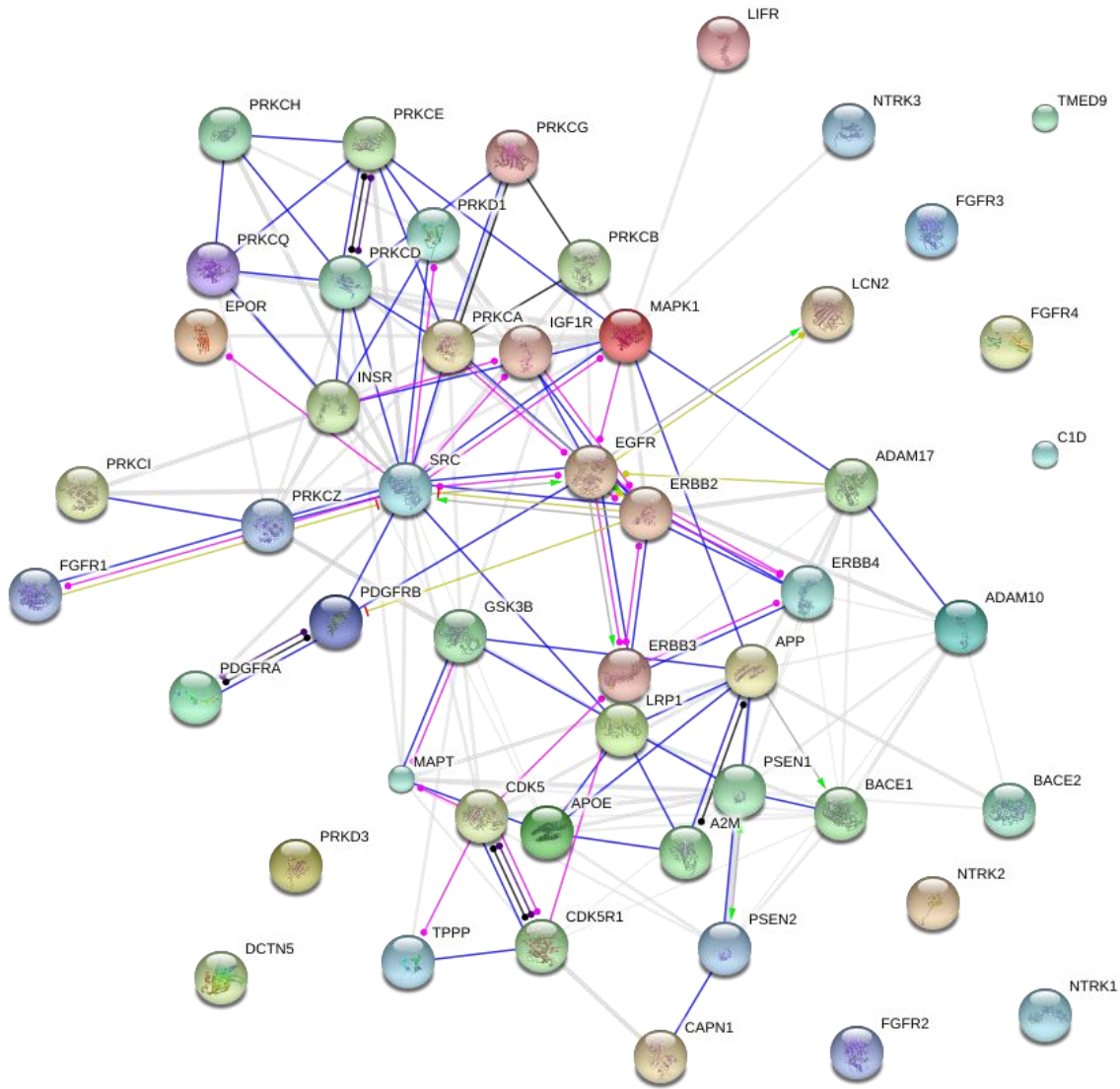


Figura 17. Interactoma de ApoE en la vía de Alzheimer, una vía bastante amplia e interconectada que involucra desde vías de señalización como MAPK, factores de crecimiento como FGFR1, EGRF2 y SRC, en la parte inferior se aprecia la de ApoE con la proteína precursora de amiloide APP y por medio de esta con ambas presenilinas PSEN1 y PSEN2 ambas relacionadas con el Alzheimer de inicio temprano. Tomada de PathCards Pathway Unification Database

Uno de los objetivos de este estudio era lograr reproducir el método establecido anteriormente por Medina Aguado para la toma, manejo y conservación del suero a analizar lo cual se cumplió sin embargo el protocolo tuvo que presentar modificaciones para lograr aumentar la eficacia de detección proteica y por disponibilidad del equipo utilizado, estas modificaciones incluyeron: el uso de columnas de 3 y 10 kDa por disposición de material, la eliminación del paso de detención de reacción por ácido trifluoroacético ya que se obtiene mejor digestión sin este paso y el periodo de digestión de la tripsina de 24 horas para una mejor separación de los péptidos. Además como se mencionó anteriormente en la tabla 15 las proteínas encontradas en el trabajo anterior fueron detectadas en este estudio pero en ambos grupos de mujeres embarazadas, sin embargo sobreexpresadas lo que da peso al hecho de que pueden funcionar como probables biomarcadores en este tipo de padecimiento.

A partir de la información obtenida en este estudio, la posibilidad de nuevas líneas de investigación es impresionante desde la implicación de la vía del complemento en abortos espontáneos humanos, establecimiento de biomarcadores de riesgo para el desarrollo demencia temprana en pacientes con SD, o continuar con la línea de investigación de diagnóstico prenatal y en un futuro servir de base para el desarrollo de técnicas de diagnóstico prenatal económicas, accesibles a nuestro medio y fáciles de realizar en cualquier laboratorio de análisis clínico como parte de un tamizaje más preciso de embarazadas de alto riesgo como el caso del estudio de ELISA (*Enzyme linked immunoSorbent Assay*), una técnica de inmunoensayo en la cual un antígeno inmovilizado se detecta por medio de un anticuerpo enlazado a una enzima capaz de generar un producto detectable por medio de una señal luminosa detectada por espectrometría.

CAPITULO VIII

8. CONCLUSIÓN

De este trabajo se pueden concluir varias cosas, la primera de ellas es el importante avance que se ha realizado tanto en instituciones públicas como privadas para la detección de pacientes con riesgo elevado de presentar productos con SD por medio de la capacitación del personal médico en la identificación de factores de riesgo en el primer nivel de atención y su referencia a un segundo nivel para la detección de marcadores ecográficos como siguiente paso en la detección, esto se observó con la importante cooperación que se obtuvo en este trabajo por parte de las instituciones de salud de donde se reclutaron las pacientes, sin embargo es necesario seguir fomentando la formación de recursos humanos competentes desde médicos generales que fungirán como médicos de primer nivel de atención detectando los factores de riesgo, además de los médicos especialistas de áreas afines como ginecología, perinatología y genética que sean capaces de detectar estas pacientes ya que día a día va siendo una necesidad creciente en particular en las zonas urbanas.

Los resultados obtenidos en este estudio son compatibles en la mayoría de ellos con los de estudios anteriores ya que aunque no muestran las mismas proteínas descritas en otros trabajos, los procesos o las vías biológicas son relacionadas, esto puede deberse a las diferencias poblacionales o las diferencias de técnicas utilizadas, puede ser de utilidad realizar un metaanálisis de todos los estudios obtenidos en este campo hasta el momento para tratar de realizar una caracterización parcial la cual puede actualizarse a medida que nuevos hallazgos vayan ocurriendo.

Por último es importante fomentar el crecimiento de la proteómica en el área de diagnóstico prenatal ya que como se mencionó anteriormente da la oportunidad de estandarización de técnicas precisas competentes con lo

actualmente establecido como el DNAfl y accesibles al público en general ya que entre más popularizada sea se logrará llegar a este objetivo más rápidamente, todo esto para el beneficio final del paciente y de la sociedad en general.

CAPITULO IX

9. ANEXOS

9.1 Carta de consentimiento informado

9.2 Hoja de recolección de datos

CAPITULO X

10. BIBLIOGRAFIA

1. Roubertoux PL, Kerdelhué B. Trisomy 21: from chromosomes to mental retardation. *Behav Genet* 2006;36:346-54.
2. Down JHL. Observation on an ethnic classification of idiots. *London Hosp Rep* 1866;3:259-62.
3. Allen G, Benda CE, Book JA, Carter CO, Ford CE, Chu E, et al. Mongolism. *Lancet* 1961;1:775.
4. Ward OC. John Langdon Down: the man and the message. *Down syndr Res Pract* 1999;6:19-24.
5. Diamandopoulos AA, Rakatsanis KG, Diamantopoulos N. A Neolithic case of Down syndrome. *J Hist Neurosci* 1997;6:86-9.
6. Lejeune J, Gautier M, Turpin R. Mongolism; a chromosomal disease (trisomy). *Bull Acad Natl Med* 1959;143:256-65.
7. Síndrome de Down. Segunda parte: estudios genéticos y función del pediatra Down syndrome. Second part: genetic surveys and pediatrician role Dras. Patricia Kaminker* y Romina Armando
8. Eugenesia. Un análisis histórico y una posible propuesta Eugenics. A historical analysis and a possible proposal Eugenia. Uma análise histórica e uma possível proposta Fabiola Villela Cortés, Jorge E. Linares Salgado
9. Prevalence of mosaicism for trisomy 21 and cytogenetic variant analysis in patients with clinical diagnosis of Down syndrome: a 24-year review (1986-2010) at the Servicio de Genética, Hospital General de México Dr. Eduardo Liceaga Luz María Garduño-Zarazúa, Lucila Giammatteo Alois, Susana Kofman-Epstein, Alicia B. Cervantes Peredo
10. Síndrome de Down. JESÚS FLÓREZ BELEDO Y EMILIO RUIZ RODRÍGUEZ Fundación Síndrome de Down de Cantabria
11. SÍNDROME de DOWN (Trisomía 21) Mercé Artigas López Asociación Española de Pediatría
12. Diagnóstico Prenatal del síndrome de Down, México: Secretaría de Salud, 2011

13. Programa Español de Salud para Personas con Síndrome de Down edición revisada 2011
14. Protocolo de diagnóstico prenatal de anomalías congénitas fetales – Versión abreviada Bibliografía ISBN: 978-84-393-7947-8
15. Advances in Non-Invasive Prenatal Diagnostic Testing Dirk van den Boom, Chief Technical Officer; Ronald M Lindsay, Executive Vice President, Strategic Planning; Sequenom Inc., San Diego, Calif. Drug and development Discovery 2013.
16. Diagnóstico prenatal no invasivo. Ácidos nucleicos de origen fetal en sangre materna Carla Sesarini¹, Pablo Argibay^{1,3}, Lucas Otaño^{2,3} Medicina (B. Aires) vol.70 no.6 Ciudad Autónoma de Buenos Aires nov./dic. 2010
17. Diagnóstico prenatal no invasivo: presente y futuro de mano de las nuevas tecnologías Marta Rodríguez de Albaa, Ana Bustamante-Aragonésa, Sara Perladoa, María José Trujillo-Tiebas, Joaquín Díaz-Recasensb, Javier Plaza-Arranzb y Carmen Ramosa d iagn prenatal. 2012;23(2):67–75
18. Cell-free fetal DNA and maternal serum analytes for monitoring embryonic and fetal status Joe Leigh Simpson, M.D. March of Dimes Foundation, White Plains, New York Fertility and Sterility® Vol. 99, No. 4, March 15, 2013
19. Nuchal translucency and chromosomal anomalies. Experiences from Matanzas Province Dra. María Eugenia Domínguez Pérez; Dra. Elsa Luna Ceballos; Dra. Aurora Núñez PortalCentro Provincial de Genética Médica. Provincia Matanzas. Cuba 2008
20. Odibo AO, Sehdev HM, Gerkowicz S et-al. Comparison of the efficiency of second-trimester nasal bone hypoplasia and increased nuchal fold in Down syndrome screening. Am. J. Obstet. Gynecol. 2008;199 (3): 281.e1-5
21. Kagan KO, Cicero S, Staboulidou I et-al. Fetal nasal bone in screening for trisomies 21, 18 and 13 and Turner syndrome at 11-13 weeks of gestation. Ultrasound Obstet Gynecol. 2009;33 (3): 259-64
22. Cell-free DNA versus intact fetal cells for prenatal genetic diagnostics: what does the future hold? Wou, Feinberg, Wapner & Simpson Expert Rev. Mol. Diagn. Early online, 1–10 (2015)
23. Chorionic Villus Sampling and Amniocentesis: Recommendations for Prenatal Counseling Richard S. Olney, Cynthia A. Moore, Muin J. Khoury, J. David Erickson, Larry D. Edmonds, Lorenzo D. Botto 1998
24. Proteomic analysis of maternal serum in down syndrome: identification of novel protein biomarkers. Nagalla SR¹, Canick JA, Jacob T, Schneider KA, Reddy

AP, Thomas A, Dasari S, Lu X, Lapidus JA, Lambert-Messerlian GM, Gravett MG, Roberts CT Jr, Luthy D, Malone FD, D'Alton ME. J Proteome Res. 2007 Apr;6(4):1245-57. Epub 2007 Mar 21.

25. Biomarker development for non-invasive prenatal diagnosis of fetal aneuploidies: predictive reliability and potential clinical application Aggeliki Kolialexi, Athanasios K. Anagnostopoulos, Georgia Tounta, Aris Antsaklis, Ariadni Mavrou, and George Th. Tsangaris EPMA J. 2011 Jun; 2(2): 157–161

26. Bead-based multiplexed immunoassays to identify new biomarkers in maternal serum to improve first trimester Down syndrome screening M. P. H. Koster, J. L. A. Pennings, S. Imholz, W. Rodenburg, G.H.A. Visser, A. de Vries and P.C.J.I. Schielen PRENATAL DIAGNOSIS Prenat Diagn(2009)

27. Paciente con anomalía de Ebstein y síndrome de Down. Una extraña combinación Jesús de Rubens-Figueroa Bruno Marino Caso clínico de interés especial Acta Pediátr Mex 2014;35:218-221.

28. Non-Invasive Screening Tools for Down's Syndrome: A Review Kelly A. Sillence, Tracey E. Madgett, Llinos A. Roberts, Timothy G. Overton and Neil D. Avent Diagnostics 2013, 3, 291-314

29. Two kinds of common prenatal screening tests for Down's syndrome: a systematic review and meta-analysis Yuan Yao, Yang Liao, Mei Han, Sheng-Lan Li0, Juan Luo & Bo Zhang Nature Scientific Reports Jan 2016

30. Quantitative Proteomics Analysis of Maternal Plasma in Down Syndrome Pregnancies Using Isobaric Tagging Reagent (iTRAQ) Varaprasad Kolla, Paul Jenö, Suzette Moes, Sevgi Tercanli, Olav Lapaire, Mahesh Choolani, and Sinuhe Hahn Journal of Biomedicine and Biotechnology Volume 2010, Article ID 952047

31. Regulation of complement activity via the alternative pathway in placentas of mouse spontaneous abortions. Takeshita A, Nagaishi S, Kondo T, Okada T, Kusakabe KT. J Vet Med Sci. 2010 Oct;72(10):1375-7

32. Critical Role and Therapeutic Control of the Lectin Pathway of Complement Activation in an Abortion-Prone Mouse Mating. Petitbarat M, Durigutto P, Macor P, Bulla R, Palmioli A, Bernardi A, De Simoni MG, Ledee N, Chaouat G, Tedesco F. J Immunol. 2015 Dec 15;195(12):5602-7

CAPITULO XI

11.AUTOBIOGRAFIA

RESUMEN AUTOBIOGRAFICO

CARLOS HORACIO BURCIAGA FLORES

Candidato para el grado de Especialista en Genética Médica

Tesis: "PERFIL PROTÉOMICO EN SUERO MATERNO DE EMBARAZOS CON
SÍNDROME DE DOWN"

Campo de estudio: Ciencias de la Salud

Datos personales: Nacido en Chihuahua, Chihuahua el 7 de Octubre de 1986 hijo
de Horacio Burciaga Elizalde y Maria Antonia Flores Cordova

Educación: Egresado de la Universidad Autonoma de Chihuahua con el grado de
Médico Cirujano y Partero en 2010